

**Univerzita Karlova**

**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



**Štěpán Balatka**

Interakce střevní mikroflóry s vybranými flavonoidy  
Interaction of gut microbiota with selected flavonoids

**Bakalářská práce**

Vedoucí práce: prof. RNDr. Petr Hodek, CSc.

Konzultant: Ing. Jakub Mrázek, Ph.D.

Praha, 2019

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracoval samostatně pod vedením školitele prof. RNDr. Petra Hodka, CSc. a všechny použité prameny jsem řádně citoval.

V Praze dne 19.8. 2019

Podpis

**Poděkování:**

V první řadě bych chtěl poděkovat prof. RNDr. Petru Hodkovi, CSc. za jeho odborné vedení, vstřícnost, trpělivost a cenné rady při zpracování této bakalářské práce. Dále bych chtěl poděkovat Ing. Jakubu Mrázkovi, PhD. z Ústavu živočišné fyziologie a genetiky AV ČR v.v.i, za odborné vedení během práce a finanční prostředky pro provedení experimentů. Poděkování si zaslouží též Bc. Pavlína Hucková za uvedení do problematiky práce a představení používaných metod.

Velké díky patří celé mé rodině, kamarádům za poskytnutou podporu a trpělivost.

# Abstrakt

Mikroflóra nacházející se na povrchu a uvnitř lidského těla je velmi rozsáhlý systém. Velmi významnou a stále ještě ne zcela prozkoumanou oblastí je střevní mikroflóra gastrointestinálního traktu. Střevní mikroflóru tvoří mnoho druhů bakterií, virů, hub nebo některé jednobuněčné eukaryotní heterotrofní organismy. Střevní mikroflóra se účastní například syntézy vitamínů, trávení polysacharidů nebo při ukládání tuků. Významně se zapojuje do metabolismu cizorodých látek a trávení potravy. Cizorodé látky mohou svým působením ovlivňovat složení střevní mikroflóry. Nesmí se opomíjet, že složení střevní mikroflóry se liší u jednotlivých jedinců a je proměnlivé během života. Metabolismus cizorodých látek ve vztahu k lidskému organismu je celosvětovým předmětem studií. Tato práce je věnována metabolismu myricetinu a jeho vlivu na trávicí trakt zdravého jedince a celiaka. Dále je studováno, zda myricetin ovlivňuje biodiverzitu střevních bakterií.

Odebrané fekální vzorky od dárce A (celiak) a B (zdravý) byly inkubovány v čase 0, 3 a 6 hodin v McDougallově pufru s myricetinem. Dále byly zkoumány metodou RP-HPLC. Cílem bylo zjistit, zda se přidaný myricetin metabolizuje vykultivovanými bakteriemi na další metabolit (např. dihydromyricetin). Při analýze byl zjištěn úbytek myricetinu v průběhu 6 hodin u obou poskytnutých vzorků, ovšem ani u jednoho vzorku se nepodařilo detekovat dihydromyricetin.

U obou fekálních vzorků byl v průběhu 72 hodin sledován vliv myricetinu na biodiverzitu vykultivovaných bakterií. K analýze byla použita metoda PCR následovaná gradientovou elektroforézou v denaturačním gelu (DGGE). Bylo zjištěno, že myricetin během 72hodinové kultivace ovlivnil složení bakterií v odebraných fekálních vzorcích.

Po DGGE byla amplifikována bakteriální DNA metodou PCR a odeslána k sekvenaci do firmy SEQme. Z některých získaných sekvencí se podařilo pomocí sekvenčních databází určit druhy bakterií, o které by se mohlo jednat. Shoda byla nalezena například s *Eubacterium rectale* nebo *Escherichia coli*. Dále byla prokázána různorodost v zastoupení bakteriálních druhů ve fekálních vzorcích u obou dárců.

**Klíčová slova:** střevní mikroflóra, myricetin, metabolismus, biodiverzita, celiakie

## Abstract

The microflora located on the surface of and inside the human body is a very large system. The intestinal microflora of the gastrointestinal tract is a very important and still not fully explored area. The intestinal microflora consists of many types of bacteria, viruses, fungi or some single-cell eukaryotic heterotrophic organisms. The intestinal microflora is involved, for example, in the synthesis of vitamins, digestion of polysaccharides or in the storing of fats. It is significantly involved in the metabolism of foreign substances and digestion of food. The activity of foreign substances can influence the composition of the intestinal microflora. It must not be forgotten that the composition of the intestinal microflora differs in separate individuals and is changeable during life. The metabolism of foreign substances in relation to the human organism is a subject of global studies. This work is devoted to the metabolism of myricetin and its influence on the digestive tract of a healthy individual and a person with celiac disease. It is also studied whether myricetin affects the biodiversity of intestinal bacteria.

The collected stool samples from donor A (a person with celiac disease) and B (a healthy control) were incubated at 0, 3 and 6 hours in McDougall buffer with myricetin. They were also investigated through the RP-HPLC method. The task was to determine whether the added myricetin was metabolized by the cultivated bacteria to a next metabolite (e.g. dihydromyricetin). In the analysis, the decrease of myricetin was detected within 6 hours for both provided samples, however, none of the samples detected dihydromyricetin.

The effect of myricetin on the biodiversity of the cultivated bacteria was monitored in both stool samples during a period of 72 hours. A PCR method followed by a denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) was used for the analysis. Myricetin was found to have influenced the composition of the bacteria in the sampled faeces during the 72-hour cultivation.

After the DGGE, the bacterial DNA was amplified through the PCR method and sent for sequencing to the SEQme company. Through comparison with sequence databases it was possible to determine the types of involved bacteria from some of the obtained sequences. A match was found, for example, with *Eubacterium rectale* or *Escherichia coli*. In addition, there has been evidence of diversity in the representation of bacterial species in the stool samples of both donors.

**Key words:** intestinal microflora, myricetin, metabolism, biodiversity, celiac disease

(In Czech)

# Obsah

1	Seznam zkratk.....	1
2	Úvod .....	2
2.1	Střevní mikroflóra.....	2
2.1.1	Druhy běžně se vyskytujících střevních bakterií .....	4
2.1.2	Využívané techniky pro určení složení střevního mikrobiomu .....	4
2.1.3	Funkce střevní mikroflóry .....	5
2.2	Celiakie .....	6
2.2.1	Gluten .....	6
2.2.2	Mechanismus a následky onemocnění .....	6
2.2.3	Rozdíl ve složení střevního mikrobiomu u osob s CD a zdravích jedinců.....	7
2.3	Potravinové doplňky .....	8
2.4	Střevní mikroflóra ve vztahu k cizorodým látkám .....	8
2.4.1	Flavonoidy .....	9
2.4.1.1	Význam flavonoidů pro rostliny .....	10
2.4.1.2	Daidzein.....	10
2.4.1.3	Myricetin .....	11
2.4.1.4	Metabolismus flavonoidních látek daidzeinu a myricetinu.....	12
3	Cíl práce .....	14
4	Materiál a metody.....	15
4.1	Materiál .....	15
4.1.1	Chemikálie.....	15
4.1.2	Přístroje.....	17
4.2	Metody .....	19
4.2.1	Příprava fekálních vzorků s myricetinem.....	19
4.2.2	Příprava vzorků pro sledování degradace MYR.....	19

4.2.3	Příprava vzorků pro určení vlivu MYR na biodiverzitu mikroflóry .....	20
4.2.4	Extrakce myricetinu z fekálních vzorků.....	21
4.2.5	Metoda RP-HPLC .....	22
4.2.6	Izolace bakteriální DNA.....	23
4.2.7	PCR-DGGE analýza bakterií .....	24
4.2.7.1	PCR .....	24
4.2.7.1.1	Kontrola PCR reakce .....	25
4.2.7.2	DGGE.....	26
4.2.8	Příprava vzorků pro sekvenování DNA fragmentů z DGGE .....	27
5	Výsledky .....	29
5.1	Reduktivní přeměna MYR střevní mikroflórou .....	29
5.1.1	Kultivace vzorků A a B s MYR.....	30
5.2	Agarosová elektroforéza .....	31
5.3	Vliv MYR na biodiverzitu střevní mikroflóry.....	32
5.4	Určení bakteriálních druhů přítomných ve fekálních vzorcích .....	34
6	Diskuse.....	35
7	Souhrn.....	38
8	Seznam literatury.....	39



# 1 Seznam zkratek

CD	celiakie
CHL	chlorzoxazon
DZ	dizygotní
dsDNA	„double-stranded DNA“ – dvouvláknová DNA
DGGE	„denaturing gradient gel electrophoresis“ – elektroforéza v gradientovém denaturačním gelu
DHM	dihydromyricetin
GCD	„gluten-containing diet“ – gluten obsahující strava
GFD	„gluten-free diet“ – bezlepková strava
GIT	gastrointestinální trakt
HPLC	„reverse phase-high performance liquid chromatography“ – vysokoúčinná kapalinová chromatografie na reverzní fázi
McD	McDougallův pufr
MYR	myricetin
MZ	monozygotní
NK-McD	negativní kontrola pro myricetin
O-DMA	<i>O</i> -desmethylangolensin
SCFA	„short-chain fatty acids“ – mastné kyseliny s krátkým řetězcem
ssDNA	„single-stranded DNA“ – jednovláknová DNA

## 2 Úvod

Lidský organismus je místem výskytu řady mikroorganismů. Organismus se během života dostane do kontaktu s řadou patogenních mikroorganismů. Nesmíme ale zapomínat na existenci mnoha prospěšných mikroorganismů, se kterými žijeme v symbióze. Tito symbionti jsou nazýváni mikroflórou. Řadu symbiotických mikroorganismů najdeme na povrchu kůže, uvnitř ústní dutiny, v dýchacích a močových cestách nebo v ženské pochvě. Nejpočetnější a jedna z nejzajímavějších mikroflór se vyskytuje ve střevech.

### 2.1 Střevní mikroflóra

Střevní mikroflóra je v současné době velmi významným předmětem celosvětových studií. Vědecké práce poukazují, že mikroflóra ovlivňuje zdravotní stav hostitele a má značný vliv na progresi různých onemocnění. Jedná se především o gastrointestinální choroby, například zánětlivé onemocnění střev nebo kolorektální karcinom. Mikroflóra přispívá také k onemocnění dalších systémů, jako jsou játra, má vliv na metabolické nemoci, psychické poruchy nebo autoimunitní a infekční onemocnění [1,2].

Mikroflóru gastrointestinálního traktu (GIT) můžeme přirovnat k velmi komplexnímu ekosystému složenému z aerobních i anaerobních mikroorganismů [3]. Toto společenství mikroorganismů tvoří tisíce druhů bakterií, viry, houby nebo některé jednobuněčné eukaryotní heterotrofní organismy [4]. Složení mikroflóry v GIT je značně proměnlivé, jak z pohledu četnosti, tak druhového zastoupení. Osídlení žaludku mikroorganismy je mnohonásobně nižší než tlustého střeva. Nižší obsah mikroflóry v žaludku způsobuje kyselé prostředí. Z tohoto důvodu zde přežijí pouze mikroorganismy rezistentní k tomuto prostředí [3]. Tyto druhy (např. *E. coli*, *Salmonella typhimurium* a *Helicobacter pylori*), které umí přežít v kyselém prostředí se vyznačují schopností vyvinout adaptivní mechanismus. Například *Helicobacter pylori* využívá ureasový mechanismus. Bakterie rozkládá močovinu na amoniak a tím neutralizuje kyselé prostředí ve svém okolí. Dalším možným mechanismem je využití DNA vázajících proteinů (HP0119), které fyzicky chrání bakterie při kyselém pH [5]. Ve střevech, kde pH přechází do alkalické oblasti osídlení mikroorganismy rapidně roste [3]. Z provedených studií vyplývá, že právě v tlustém střevě se vyskytuje největší zastoupení mikroflóry. Studie odhadují, že lidská mikroflóra obsahuje až  $10^{14}$  bakteriálních buněk. To je 10x více než je lidských buněk přítomných v těle. Počet bakteriálních buněk v GIT se zvyšuje směrem k análním otvoru. V žaludku a dvanáctníku se odhaduje  $10^1$ - $10^3$  bakterií na gram obsahu, v lačníku a tračníku

se odhaduje množství na  $10^4$ - $10^7$  bakterií na gram obsahu. V tlustém střevě je toto množství až  $10^{11}$ - $10^{12}$  bakteriálních buněk na gram obsahu [6].

Dlouhou dobu byl lidský plod považován za mikrobiologicky sterilní. S tím je spojené, že kojenecké tělo je mikroorganismy od matky, ze stravy a z okolního prostředí osidlováno až po narození. Ovšem nedávné studie naznačují něco jiného. Podle nich může docházet k vystavení mikroorganismům už během těhotenství. Ukazuje se, že plod může přijít do styku například s placentárními bakteriemi [7]. Po narození dochází k první kolonizaci novorozence mikroorganismy. Velký podíl na složení mikroflóry nově narozeného jedince má způsob porodu. Při přirozeném porodu přichází novorozenec nejprve do kontaktu s vaginální mikroflórou matky a tomu odpovídá i osídlení jeho těla mikroorganismy. U novorozenců narozených císařským řezem je osídlení mikroorganismy značně nižší a odlišné než u novorozenců narozených běžnou cestou. U těchto dětí dochází ke kontaktu s mikroorganismy z pokožky matky. Další vývoj mikroflóry u novorozenců bývá během prvních týdnů dynamický a postupně se stabilizuje, předpokládá se, že až do věku tří let. U zdravého dospělého jedince bývá mikroflóra stabilní. To ovšem neznamená absolutní stabilitu mikroflóry daného jedince. Složení mikroflóry je proměnlivé během života a závisí na životním stylu, prostředí, ve kterém jedinec žije, na složení jeho stravy, na užívaných lécích, na hormonálních změnách během puberty nebo také na nemocech, se kterými přijde jedinec do kontaktu [8].

Jedním z dalších aspektů ovlivňující složení mikroflóry jedince je genetická informace předaná od rodičů. V jedné ze studií byly pozorovány dva páry dvojčat, monozygotní (MZ) a dizygotní (DZ). Oba páry sdílely stejné prostředí. Studie ukázaly, že celkové kompozice mikroflóry se u MZ a DZ dvojčat výrazně nelišily. U MZ dvojčat byl rozdíl mnohem menší. Touto studií byl prokázán vliv genetických dispozic, avšak vliv prostředí je mnohem silnější, a tudíž u nezávislých jedinců lze očekávat výrazné změny ve složení mikroflóry [4].

Ve studii Ruggles a kol. [9] byly zkoumány vlivy stravy a prostředí na složení mikroflóry mezi domorodci z deštného pralesa a lidmi z civilizované společnosti (5 dospělých a 2 děti). Studií byla prokázána větší diverzita ve složení střevní mikroflóry u domorodců než u jedinců z města. Jedinci z civilizované společnosti byli na 16 dní přemístěni do vesnice v pralese a ponecháni žít tradiční život se stravou s nízkým obsahem tuků a vysokým obsahem vlákniny, bez elektřiny a bez hygienických prostředků. Již během

těchto 16 dní byly sledovány změny v jejich mikrobiomu a porovnávány s místními domorodci. Výsledkem u dospělých jedinců byla změna mikroflóry na kůži, u dětí se změnila také mikroflóra ve střevě a na nosní sliznici.

### 2.1.1 Druhy běžně se vyskytujících střevních bakterií

Složení střevní mikroflóry tvoří převážně bakterie. Hlavní zastoupení mají fakultativně anaerobní a striktně anaerobní druhy, v malé míře se vyskytují i aerobní bakterie. Fakultativně anaerobní bakterie tolerují přítomnost kyslíku a dokáží růst i bez něho, kdežto striktní anaerobové rostou pouze za nepřítomnosti kyslíku. Mezi fakultativně anaerobní bakterie patří např. rody *Bifidobacterie*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*. Striktně anaerobními bakteriemi jsou např. *Bacteriodes*, *Clostridium*, *Enterobacterium* [10].

Během zkoumání střevní mikroflóry bylo zjištěno, že značné množství druhů bakterií vyskytujících se v GIT nelze kultivovat. Obtíže při kultivaci spočívají ve složitosti nabuzení a dodržení přesných podmínek, které by byly vhodné a podobné prostředí ve střevech. Ovšem při dodržení přesných anaerobních podmínek při kultivaci lze kultivovat okolo 50 % druhů bakterií vyskytujících se právě v GIT. U dospělých jedinců byly kultivací prokázány zejména bakterie rodu *Bacteriodes*, *Bifidobacterie*, *Clostridium*, *Coprococcus*, *Eubacterium* [10].

### 2.1.2 Využívané techniky pro určení složení střevního mikrobiomu

Kultivace bakterií má kromě náročnosti dodržet přesné podmínky i další nevýhody. Neboť kultivovat a studovat lze pouze bakterie, které jsou exkretovány z těla společně s nestravitelnou potravou, proto bylo nutné najít vhodnější techniky, které by přiblížily zastoupení jednotlivých druhů.

Jednou z těchto technik je metoda PCR (z angličtiny „polymerase chain reaction“ – polymerasová řetězová reakce). Jedná se o metodu molekulární biologie používanou k amplifikaci ribosomální DNA. U bakterií se využívá sekvenace části bakteriální 16S rRNA. Bylo zjištěno, že tento úsek bakteriálního genomu se vyskytuje u všech druhů bakterií a současně obsahuje velmi variabilní části, podle kterých lze rozeznat jednotlivé druhy bakterií od sebe navzájem. Díky sekvenování DNA kódující gen pro 16S rRNA mohla být určena genetická diverzita mikrobiálních komunit, také bylo identifikováno několik nekultivovatelných druhů mikroorganismů. Proto, aby bylo možné identifikovat zastoupení jednotlivých bakteriálních kmenů ve střevním mikrobiomu, se často metoda PCR propojuje

s elektroforetickou metodou DGGE (z anglického „denaturing gradient gel electrophoresis“), jak již plyne z anglického názvu jedná se o elektroforézu v gradientovém denaturačním gelu. Pro elektroforézu se používá polyakrylamidový gel, ve kterém se postupně zvyšuje koncentrace denaturačních látek [11].

### 2.1.3 Funkce střevní mikroflóry

Složení střevní mikroflóry má zásadní význam pro schopnost zachovat správné funkce GIT. Mezi hlavní funkce přirozené mikroflóry patří inhibovat kolonizaci GIT patogenními mikroorganismy. Mikroflóra také pomáhá při syntéze vitamínů (biotin – vitamín B<sub>7</sub>, vitamín B<sub>12</sub>, vitamín B<sub>2</sub> – riboflavin, kyselina listová nebo vitamín K [12]). Mikroflóra stimuluje nespecifické imunitní systémy hostitele. Střevní mikroflóra hraje roli při trávení polysacharidů, ukládání tuků, při regulaci angiogeneze a má vliv na rozvoj chování [13]. Další funkcí je napomáhat při metabolismu vedlejších produktů léčiv a endogenních látek přijatých z potravy. V případě, že antimikrobiální látky přijaté z potravy nebo léčiv jsou špatně absorbovány z GIT, může dojít ke změně střevní mikroflóry. Tato změna může mít za následek například průjemová onemocnění [14].

Mikroflóra zajišťuje fermentaci vlákniny, která je pro lidské tělo prakticky nestravitelná. Vláknina prochází GIT až do tlustého střeva, kde dochází k její fermentaci bakteriemi. Po fermentaci potravy tělo získá řadu metabolitů, jejichž hlavní složkou jsou SCFAs (z angl. „short-chain fatty acids“ – mastné kyseliny s krátkým řetězcem). SCFAs jsou nasycené alifatické organické kyseliny zastoupené především acetátem, propionátem a butyrátem [15]. Ačkoli SCFAs jsou pro mikroflóru odpadní produkty, není možné opomenout jejich důležitost v metabolismu lipidů, glukosy a cholesterolu [16]. SCFAs představují substráty zpracováváné v řadě metabolických drah. Dále SCFAs plní funkci signálních molekul. Mimo to, butyrát je využíván i jako zdroj energie pro kolonocyty [15]. SCFAs reagují na povrch střeva se specifickými G-proteinovými receptory (například GPR41, GPR43 a GPR109A), které regulují zánětlivé a karcinogenní procesy uvnitř střev. Tyto receptory dále ovlivňují kardiovaskulární systém, alergické reakce a centrální nervový systém. SCFAs receptory mají též význam terapeutický. Například niacin, ligand pro receptor GPR109A, se využívá pro zlepšení kardiovaskulárního zdraví už několik desetiletí. Nedostatek niacinu může vést k průjmu, dermatitidě nebo demenci. U myši bylo zjištěno, že niacin indukuje protizánětlivé a antikarcinogenní prostředí ve střevě právě prostřednictvím GPR109. To demonstruje možnosti terapeutického využití těchto receptorů

[17]. Střevní bakterie (např. *E. coli*, *Bacteroides intestinalis*, *Bacteroides fragilis* [18]) se účastní též přeměny žlučových kyselin na různé typy sekundárních žlučových kyselin [19].

## 2.2 Celiakie

Celiakie (CD, z angl. „celiac disease“) je chronické zánětlivé onemocnění tenkého střeva. Toto onemocnění je způsobeno imunitní reakcí na gluten (lepek). V současné době se CD považuje za nejběžnější nízko-diagnostikovanou potravinovou intoleranci, která postihuje přibližně 1% evropské populace [20].

Jedná se o geneticky podmíněné onemocnění, které je vyvoláno přítomností lepku ve stravě a poruchami ve složení mikrobiomu, konkrétně v jeho složení [21]. CD se může projevit u disponovaného jedince kdykoliv během života, a to ať v raném dětství nebo až ve stáří [22]. U některých jedinců se nemusí projevit nikdy.

V současné době zatím není znám žádný lék, který by CD dokázal vyléčit. Jediným a účinným způsobem je dodržování celoživotní bezlepkové diety. Hlavní důvod neexistence léku na CD představuje malá míra trávení glutenu gastrointestinálními proteasami v GIT. Vývoj léku na CD je pouze v začátcích. Ale už teď představuje pro vědce výzvu, protože každý nový lék by měl být účinný a zároveň stejně bezpečný jako bezlepková dieta [23].

### 2.2.1 Gluten

Gluten se vyskytuje v pšenici, žitu, ječmeni a ovsu [24]. Termín gluten označuje směs stovek obilných proteinů, které se vyznačují vzájemnou příbuzností a zároveň se od sebe odlišují. V největší míře má ve směsi zastoupení glutenin, jenž bývá doplněn o další proteiny. Tyto proteiny se souhrnně označují jako prolaminy. Další proteiny patří mezi prolaminy jsou například gliadin, secalin, hordein a avenin [22]. Prolaminy nejsou rozpustné ve vodě, ovšem dají se extrahovat z ethanolu. Tyto proteiny obsahují vysoký podíl glutaminových a prolinových zbytků. Jednotlivé glutenové proteiny se mezi sebou váží především díky silným kovalentním a nekovalentním vazbám. Významnou vlastností glutenu je jeho tepelná odolnost, a proto se využívá jako pojidlo. Gluten se používá v potravinářství a farmacii, především jako emulgátor a plnidlo [24].

### 2.2.2 Mechanismus a následky onemocnění

Onemocnění CD je způsobeno přítomností HLA („Human Leucocyte Antigen“) genů II. třídy. Jedná se o heterodimery HLA-DQ2 a HLA-DQ8. Tyto geny se nachází zhruba u 30-35% světové populace. U jedinců, kteří tento gen mají přítomný ve svém genotypu se

CD projeví zhruba u 2-5 % z nich. To nasvědčuje vlivu dalších faktorů, které způsobí manifestaci nemoci. Těmito faktory může být například příliš brzké vystavení kojence glutenu nebo infekce enteropatickými viry. Tyto faktory mohou způsobit nerovnováhu ve střevním traktu, a proto jsou spojovány s vývojem CD [25].

Jak již bylo zmíněno u CD se jedná o imunitní reakci na gluten. Přítomnost gliadinu v těle u pacientů s CD aktivuje vrozenou imunitní odpověď, přítomnost lepku aktivuje mechanismus specifické imunity. Jakmile se glutenové peptidy dostanou na povrch střevní sliznice („lamina propria“), ve které se nachází tkáňová transglutaminasa, která katalyzuje vznik imunostimulačních epitopů, které mají vysokou afinitu k molekulám HLA (sérotyp DQ2 a DQ8) přítomných na antigen prezentujících buňkách. Vazba těchto epitopů na receptory vede k nárůstu tvorby deamidovaných glutenových peptidů a k aktivaci T lymfocytů, které vyvolají imunitní odpověď. Aktivované T lymfocyty vylučují cytokiny (např. IFN- $\gamma$ ), které indukují uvolňování metaloproteinas myofibroblasty. Tyto metaloproteinasy ovlivňují formování sliznice střeva. Pro atrofii klků ovšem není účinek metaloproteinas dostatečný. Proto je možné, že poškození střevního epitelu (typické pro CD) podporují cytotoxické intraepiteliální lymfocyty, které rozpoznávají ligandy produkované zánětlivými stimuly na povrchu střevního epitelu. Tento stav vede nakonec k pronikání zánětu dovnitř tkáně [26].

Za aktivaci vrozené imunitní odpovědi střevních epiteliálních buněk zodpovídá gliadin. Tento peptid přímo stimuluje imunitní odpověď makrofágů a dendritických buněk přes receptory (např. toll-like receptory), to vede k dozrávání buněk s těmito receptory a sekreci zánětlivých cytokinů. Důsledkem toho se zvýší specifická imunitní odpověď namířená proti lepku a vzroste střevní propustnost. Z provedených studií CD se zdá, že vrozená imunitní odpověď podporuje rozvoj specifické imunitní odpovědi na lepek [26].

### **2.2.3 Rozdíl ve složení střevního mikrobiomu u osob s CD a zdravích jedinců**

Jak již bylo zmíněno v úvodním odstavci, střevní mikrobiom je v posledních dvou desetiletích velmi intenzivně studován. Ve studiích se velmi často porovnává střevní mikroflóra zdravých jedinců s jedinci, kteří trpí různými nemocemi, jež mají souvislost se střevní mikroflórou. Porovnáváno bylo například složení mikroflóry zdravého člověka s dvěma typy celiaka. S jedním, jenž byl na bezlepkové stravě (GFD – z angl. „gluten-free diet“) a druhým jehož strava lepek obsahovala (GCD – z angl. „gluten-containing diet“).

V těchto studiích byl zjištěn rozdíl v zastoupení jednotlivých druhů bakterií ve střevech hostitele s CD (pacient GFD a GCD) oproti zdravému jedinci. U zkoumaných pacientů s CD je zvýšené množství bakterií *Staphylococcus*, *Clostridium* a *Eubacterium* naopak klesá počet bakterií *Lactobacillus* spp. Zároveň roste podíl gram-negativních bakterií *Bacteroides*, *E. coli* a klesá podíl probiotických a protizánětlivých *Bifidobacterium* [26,27]. Ovšem ze studie Collado a kol. [28] vyplývá, že pokud pacient dodržuje bezlepkovou dietu, tak dochází k návratu v zastoupení *E. coli* a *Staphylococcus* do normálu.

Ve studii Sánchez a kol. [29] byly porovnávány tři skupiny lidí. První skupinou byly osoby s CD, kteří dodržují bezlepkovou dietu, druhou, ti, kteří mají CD a gluten běžně přijímají a třetí skupinou byli zdraví jedinci. Výsledek práce ukázal rozdíly v různorodosti osídlení střev u jednotlivých skupin osob. Největší diverzita byla pozorována u osob s CD, kteří jsou na běžné GCD, následovala ji skupina s CD dodržující dietu. Nejmenší různorodost ve složení střevní mikroflóry byla pozorována u zdravých jedinců. Hlavním rozdílem bylo zastoupení kmene *Proteobacteria*, které bylo vyšší u osob s CD, jejichž strava gluten obsahuje než u zbylých dvou skupin, zatímco zastoupení kmene *Firmicutes* bylo nižší.

## 2.3 Potravinové doplňky

V současné době lidská populace používá čím dál víc přípravků, které doplňují běžnou stravu. Tyto přípravky se označují jako doplňky stravy a jejich hlavním účelem je zvyšovat množství nutričních látek a snižovat riziko onemocnění. Mezi tyto doplňky patří například vitamíny, minerální látky, aminokyseliny, specifické mastné kyseliny nebo různé výtažky z bylin a rostlin. Na trhu jsou dostupné jednosložkové i různě kombinované potravinové doplňky [30]. Těmito látkami se ovšem obohacují i běžné potraviny (např. některé mléčné výrobky, nápoje).

## 2.4 Střevní mikroflóra ve vztahu k cizorodým látkám

Existuje mnoho látek, které si lidský organismus nedokáže syntetizovat sám. Proto jsou tyto látky přijímány z vnějších zdrojů prostřednictvím potravy. Velký význam mají antioxidanty, které chrání organismus proti molekulám volných radikálů. Příkladem antioxidantů přijímaných v potravě jsou retinol a kyselina askorbová. Dalšími takto přijímanými látkami, které si lidský organismus nedokáže sám syntetizovat jsou další vitamíny či minerální látky a stopové prvky (např. vápník, fluor, jód, železo atd.). Nezbytné jsou též esenciální aminokyseliny (např. L-arginin, L-lysin) a nenasycené mastné kyseliny.



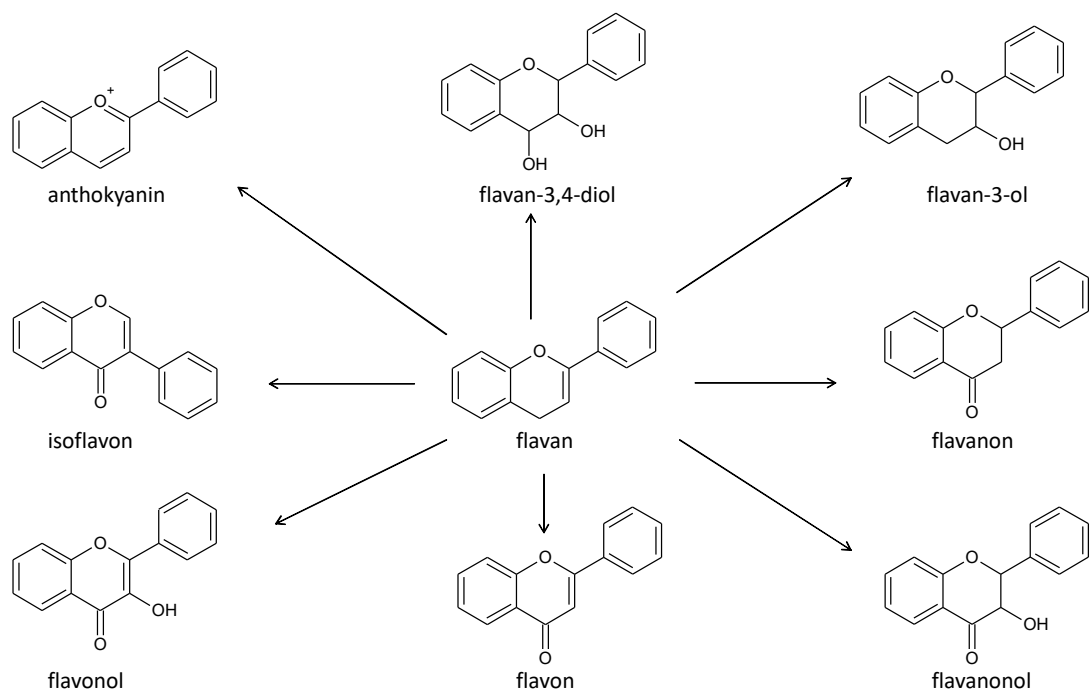
Jedná se tedy o tělu cizorodé látky vyskytující se v živočišné a rostlinné stravě. Zdrojem cizorodých látek mohou být i již zmíněné potravinové doplňky.

Velmi významnou skupinu cizorodých látek tvoří flavonoidy, přijímané tělem především z rostlinné stravy. Většina takto přijatých látek se přeměňuje v GIT na další metabolity (např. daidzein → dihydrodaidzein). Některé látky se mohou transformovat i v játrech nebo přímo ve specializovaných buňkách, enterocytech.

#### **2.4.1 Flavonoidy**

Flavonoidy patří mezi sekundární metabolity produkované cévnatými rostlinami. Jedná se o nejrozšířenější fenolické sloučeniny. Struktura flavonoidů je odvozena od flavanového skeletu, složeného z 15 atomů uhlíku uspořádaných do tří kruhů ( $C_6-C_3-C_6$ ), prostřední kruh obsahuje heteroatom, kyslík [31]. Struktura flavanového skeletu je znázorněna na Obrázku 1 (str. 10), systematicky se skelet nazývá 2-fenyl-1,4-benzopyron. Podle substituentů navázaných na skelet v různých pozicích lze flavonoidy rozdělit do osmi hlavních skupin: flavony, flavonoly, flavanony, flavanonoly, isoflavony, flavan-3-oly, flavan-3,4-dioly (flavandioly) a anthokyaniny [32]. Struktury jednotlivých skupin flavonoidů jsou znázorněny na Obrázku 1 (str. 10).

Existuje přes 8000 sloučenin zařazovaných mezi flavonoidní látky. Nejčastěji se vyskytují v rostlinách jako glykosidy. Flavonoidy jsou rozsáhle studovány pro svou antioxidační kapacitu, která zahrnuje vychytávání a blokování reaktivních forem kyslíku (např. peroxidové, hydroxidové a superoxidové radikály) [31].



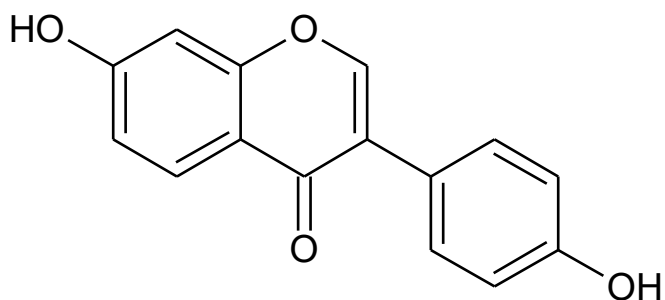
Obrázek 1: Struktura flavanového skeletu a dalších flavonoidů. Jednotlivé struktury byly vytvořeny v programu ChemSketch 12.01.

#### 2.4.1.1 Význam flavonoidů pro rostliny

Rostliny, které produkují sekundární metabolity mají existenční výhody oproti rostlinám, které je netvoří. Například flavonoidy rostlinu chrání proti biotickým faktorům jako jsou patogeny a býložravci, které odpuzují. Dále rostlinu chrání proti abiotickým faktorům jako UV záření, vysoké a nízké teploty a těžké kovy. Flavonoidy mají pro rostlinu značný význam díky svým antioxidačním vlastnostem, tím udržují stabilní redoxního stav v buňkách. Flavonoidy působí také jako atraktanty pro hmyz, ptáky a další živočichy, neboť rostlině dodávají barvu, vůni a chuť jejím plodům. Flavonoidy mohou také zprostředkovávat specifický vztah rostliny se symbiotickými bakteriemi, například *Rhizobium* [33].

#### 2.4.1.2 Daidzein

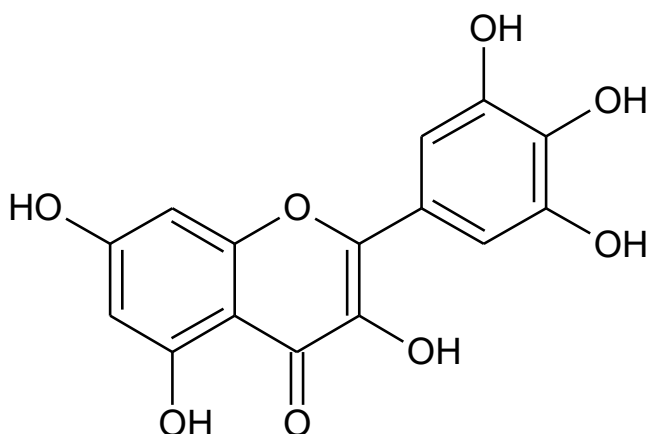
Daidzein, chemickým názvem 4',7-dihydroxyisoflavon patří mezi isoflavonony. Strukturní vzorec je znázorněn na Obrázku 2 (str. 11). Daidzein se vyskytuje ve velkém množství v luštěninách, převážně v sójových bobech, ve formě glukosidu daidzinu [34]. Strukturně se daidzein podobá savcím estrogenům, a proto se v těle váže na estrogenové receptory a ovlivňuje jejich expresi, dále vyvolává buněčnou transkripci. Daidzein působí jako antioxidant a také vykazuje estrogenovou aktivitu [34,35]. Bylo zjištěno, že daidzein zvyšuje proliferaci rakovinných buněk ve vaječnících. Tudíž ovlivňuje procesy ve vaječníku, a to prostřednictvím regulace proliferace a apoptosy zdravých buněk ve vaječnících [36].



Obrázek 2: Strukturní vzorec daidzeinu. Struktura byla vytvořena v programu ChemSketch 12.01.

#### 2.4.1.3 Myricetin

Myricetin (MYR), systematickým názvem 3,3',4',5,5',7-hexahydroxyflavon, se řadí mezi flavonoidy ze skupiny flavonolů. Strukturní vzorec je znázorněn na Obrázku 3 (str. 12). MYR byl poprvé izolován v Indii z kůry *Myrica nagi* Thunb., jako světle žlutá krystalická látka [37]. Samotný MYR se špatně rozpouští ve vodě, jeho rozpustnost při 25 °C je 54,9 mg/l [38]. Vyšší rozpustnost je v zásaditých vodných roztocích a v některých organických rozpouštědlech, například v acetonu nebo tetrahydrofuranu. MYR se v rostlinách objevuje ve vysokém množství. Vyskytuje se především u rostlin z čeledi Vřesnovitých (*Myricaceae*), Ledvinovníkovitých (*Anacardiaceae*), Rdesnovitých (*Polygonaceae*), Borovicovitých (*Pinaceae*) a Prvosenkovitých (*Primulaceae*). U některých je přítomen v listech, u jiných v kořenové kůře, či vzdušných částech. MYR se vyskytuje kromě těchto čeledí také v ovoci a zelenině. MYR je obsažen v zelených a bylinných čajích, dále v ovocných bobulích (víno, rybíz, borůvky) [37]. MYR se přidává i do mnoha doplňků stravy, pro jeho příznivé farmakologické účinky *in vivo* a *in vitro* [39]. Je prokázáno, že MYR působí protizánětlivě, protinádorově, dále má analgetické, hepatoprotektivní a antidiabetické účinky. Taktéž byl prokázán ochranný účinek MYR proti progresi Alzheimerovi a Parkinsonovi choroby. Dále bylo prokázáno, že MYR vykazuje antibakteriální a antivirové účinky. Působí proti gram-negativním anaerobním patogenům, jako je například *Prevotella intermedia*. Mezi viry MYR působí inhibičně na reverzní transkriptasy pro HIV [40].



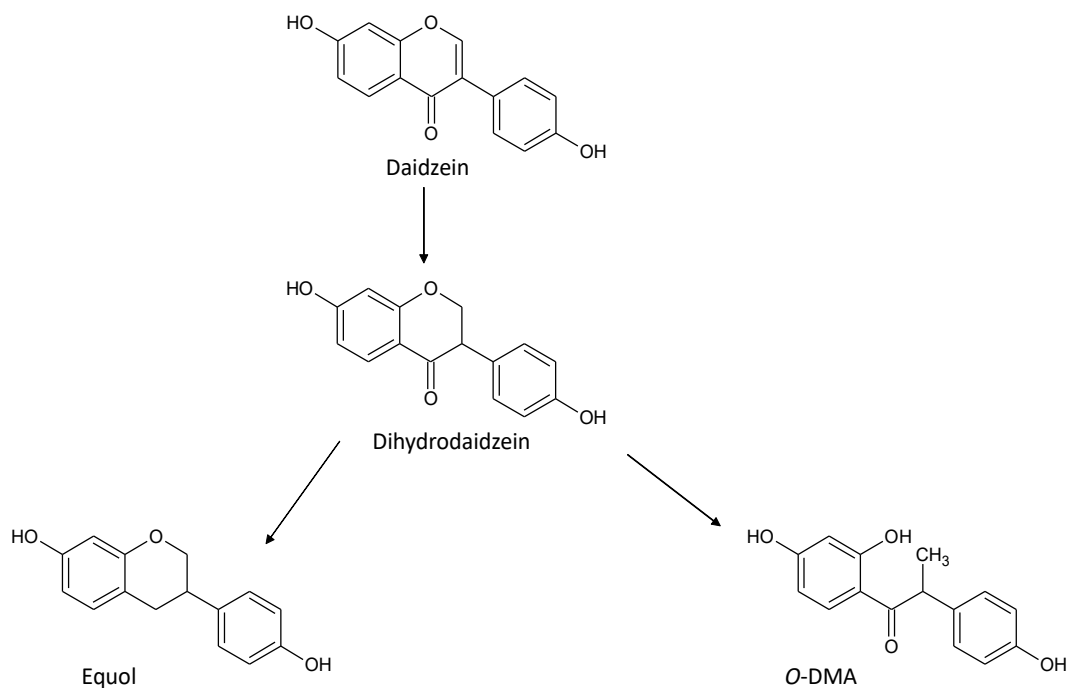
Obrázek 3: Strukturní vzorec myricetinu. Vzorec byl vytvořen v programu ChemSketch 12.01.

#### 2.4.1.4 Metabolismus flavonoidních látek daidzeinu a myricetinu

Metabolismus daidzeinu se podařilo prozkoumat. Tento flavonoid je metabolizován na redukované formy (např. dihydrodaidzein, equol, tetrahydrodaidzein, *O*-desmethylangolensin (*O*-DMA)) [41]. Vybrané metabolity jsou uvedeny na Obrázku 4 (str. 13). Ve studiích Rafii a kol. [34] a Frankenfeld a kol. [35] byl sledován vliv střevních bakterií při metabolismu přijatého daidzeinu.

V práci Rafii a kol. [34] byl sledován metabolismus daidzeinu u šesti dospělých jedinců, kteří přijímali ve své stravě luštěniny obsahující tento flavonoid. Každý jedinec poskytl jeden až tři vzorky. Během dvou týdnů bylo získáno celkem 10 fekálních vzorků. Z těchto vzorků byly za anaerobních podmínek kultivovány bakterie. Z pohledu přeměny na jednotlivé metabolity byl výsledek nejednoznačný. U šesti vzorků nedošlo k žádné přeměně, v jednom vzorku byl objeven dihydrodaidzein, ve dvou se podařilo detekovat equol a *O*-DMA, ve zbylém byl nalezen dihydrodaidzein společně s equolem. Ze studie plyne, že se metabolity daidzeinu liší, jak u jednotlivců, tak i u samotného jedince v závislosti na čase odběru vzorku.

Ve studii Frankenfeld a kol. [35] byl pozorován vliv daidzeinu na obezitu u dospělých jedinců. Stejně jako v práci Rafii a kol. [34] byl pozorován vliv střevních bakterií na přeměnu daidzeinu na jeho metabolické produkty. Z analýzy fekálních vzorků dospělých jedinců podrobených této studii, bylo zjištěno, že fenotypy produkující *O*-DMA a fenotypy neprodukující equol jsou u dospělých jedinců spojeny s obezitou.



Obrázek 4: Metabolismus daidzeinu a jeho produkty. Vytvořeno v programu ChemSketch 12.01.

Stejně jako v případě daidzeinu existuje redukovaná forma vznikající z MYR. Touto formou je dihydromyricetin (DHM), který se běžně vyskytuje v rostlinách, jako jejich sekundární metabolit. Obdobně jako je daidzein přeměňován střevními bakteriemi na redukované metabolické produkty, tak se očekává, že by i MYR mohl být metabolizován na DHM. Ovšem toto nebylo ještě prokázáno, a proto se touto problematikou budeme zabývat v následující práci.

### 3 Cíl práce

Cílem této práce bylo zjistit, zda jsou střevní bakterie zdravého jedince a pacienta s celiakií schopné přeměnit myricetin na dihydromyricetin. Dále sledovat ovlivnění biodiverzity bakterií přítomností MYR.

Pro řešení tohoto cíle je třeba splnit následující úkoly:

- za anaerobních podmínek (během tří dnů) vykultivovat bakterie z obou fekálních vzorků v přítomnosti MYR
- za pomoci vysokoúčinné kapalinové chromatografie zjistit, zda dochází ve fekálních vzorcích k přeměně MYR na DHM.
- izolovat bakteriální DNA a pomocí metody PCR-DGGE pozorovat vliv MYR na složení bakteriální mikroflóry
- porovnat zastoupení střevních bakteriálních druhů mezi oběma jedinci, jenž poskytli fekální vzorky

## **4 Materiál a metody**

### **4.1 Materiál**

#### **4.1.1 Chemikálie**

##### **APIChem (Čína)**

- dihydromyricetin

##### **BioConcept (Švýcarsko)**

- 50x TAE pufr

##### **Experimentální fekální vzorky**

- Lidské fekální vzorky byly získány od dvou dárců. Vzorek A poskytl dárcce trpící celiakií a dodržující bezlepkovou dietu. Vzorek B poskytl zdravý jedinec.

##### **Invitrogen (USA)**

- 10x TBE pufr

##### **J.K.Baker (USA)**

- methanol

##### **Lach-Ner (Česká republika)**

- ethylacetát
- 99% kyselina octová

##### **Linde (Česká republika)**

- dusík
- kyslík
- vodík

##### **New England BioLabs (USA)**

- standardní vzorek DNA – Quick-Laod® 200bp DNA Ladder

**OXOID (Anglie)**

- sáček pro vytvoření anaerobního prostředí při odběru vzorků – AnaeroGen™ 3.5L

**QIAGEN (Německo)**

- QIAamp® PowerFecal® DNA Kit

**Serva (Německo)**

- agarosa
- močovina
- persulfát amonný

**Sigma – Aldrich (USA)**

- akrylamid
- formamid
- chlorzoxazon
- SYBR Green

**Tokyo Chemical Industry Co., Ltd. (Japonsko)**

- myricetin

**Top – Bio (Česká republika)**

- dH<sub>2</sub>O
- PCR ethidiumbromid
- PCR mix – PPP Master Mix

**VWR Chemicals (USA)**

- *N,N,N',N'*-tetramethylethylendiamin



### **4.1.2 Přístroje**

#### **Analytické váhy**

- Discovery DV215CD, Ohaus Corporation, Švýcarsko

#### **Centrifugy**

- EBA 270, Hettich, Německo
- MSE Sanyo HAWK 15/05 Refrigerated Centrifuge, Sanyo Gallenkamp PLC, U.K.
- PrismR, Labnet International, Inc., USA

#### **Homogenizátor**

- FastPrep®-24, M. P. Biomedicals, USA

#### **HPLC kolona**

- Chromolith RP-18 E, Merck, Německo

#### **HPLC systém**

- Agilent 1200 Series HPLC Systém, Agilent Technologies, USA
  - Automatický dávkovač
  - Čtyřkanálová peristaltická pumpa
  - Vakuový degasser
  - Kolonový termostat (LCO102, ECOM s.r.o, Česká republika)

#### **Injekční stříkačka**

- MICROLITER Syringe 702RN, Hamilton, Švýcarsko

#### **Inkubátor**

- Biological Thermostat BT 120, Laboratorní přístroje Praha, Česká republika

#### **Magnetická míchačka**

- ESP stirrer, VELP Scientifica, Evropa

### **NanoDrop**

- Thermo Scientific™ NanoDrop™ One, ThermoFischer Scientific, USA

### **PCR cyclers**

- Biometra Tadvanced 96 SG, Biometra GmbH, Německo

### **Peristaltické čerpadlo a dávkovač**

- PCD 21, Kouřil, Česká republika

### **Předvážky**

- KERN PLS 1200-3A, Kern & Sohn GmbH, Německo
- KERN EW600-2M, Kern & Sohn GmbH, Německo

### **Vakuová pumpa**

- Laboport, KNF Lab, USA

### **Vakuové centrifugační odpařovací zařízení**

- CentriVap, Labconco, USA

### **Vodní lázeň**

- Julabo TW12, Julabo Labortechnik GmbH, Německo

### **Vortexy**

- Vortex-Genie 2, Scientific Industries, Inc. Bohemia, USA
- Vortex Mixer, Labnet International, Inc., USA
- BV 101-G Vornado Miniature Vortex Mixer, Benchmark Scientific Inc., USA

### **Zařízení pro vertikální gelovou elektroforézu**

- The DCode™ Universal Mutation Detection System, Bio-Rad, USA

## **Zdroj pro elektroforézu**

- PowerPac Basic, Bio-Rad, USA

## **Zobrazovací zařízení pro dokumentaci gelu**

- Molecular Imager® GelDoc™ XR+, Bio-Rad, USA

## **4.2 Metody**

Pro ilustraci postupu práce shrnutého v textu v kapitole 4.2.1 až 4.2.3 je k práci přiložen Obrázek 5 (str. 21), kde je schematicky uvedena příprava všech vzorků.

### **4.2.1 Příprava fekálních vzorků s myricetinem**

Kultivace byla prováděna v „chudém“ McDougallově pufru (dále označeno McD). Návod pro přípravu je v práci McDougall [42], diluční roztok byl připraven podle Verdu a kol. [27]. McD pufr i diluční roztok byly připraveny za anaerobních podmínek. McD pufr byl rozdělen po 8 ml do 33 zkumavek typu Hungate (dále v textu pouze kultivační zkumavky), diluční roztok byl dávkován do 3 skleněných lahvíček 2x po 20 ml a 1x po 30 ml. Do 30 ml dilučního roztoku byl připraven zásobní roztok MYR o koncentraci 0,24  $\mu\text{mol/ml}$ . Příprava probíhala za současného zavádění plynu o složení 75 %  $\text{N}_2$ , 25 %  $\text{CO}_2$  a 5 %  $\text{H}_2$  (dále „konzervační plyn“) pro dodržení anaerobních podmínek. Dále byla připravena suspenze obsahující fekální vzorky. Do 20 ml dilučního roztoku bylo přidáno po 1 g od vzorku A resp. B. Příprava byla opět provedena za zavádění „konzervačního plynu“. Dále byly připraveny fekální vzorky s MYR pro sledování degradace MYR (viz. kapitola 4.2.2) a pro zjištění biodiverzity fekálních bakterií (viz. kapitola 4.2.3).

### **4.2.2 Příprava vzorků pro sledování degradace MYR**

Do pěti kultivačních zkumavek s 8 ml McD pufru bylo přidáno po 1 ml roztoku MYR. Tyto vzorky byly připraveny pro všechny časy inkubace (0, 3, 6, 24 a 72 hodin).

Dále byly připraveny roztoky vzorků bez přidaného MYR (negativní kontrola, NK-McD). Anaerobně bylo injekční stříkačkou odebráno po 1 ml připravené suspenze fekálních vzorků a přes septum aplikováno do dalších 2 kultivačních zkumavek (pro každý vzorek) s McD pufrem. Jedna zkumavka byla zamrzena a uchována při  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  (NK-McD v  $t = 0$ ), druhá byla uložena do inkubátoru (Biological Thermostat BT 120), kde byla nastavena teplota inkubace na  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Zbylé množství 19 ml inokula vzorků A i B bylo přes septum zaočkováno injekční stříkačkou po 1 ml do 24 kultivačních zkumavek s McD pufrem a přidáno po 1 ml zásobního roztoku MYR.

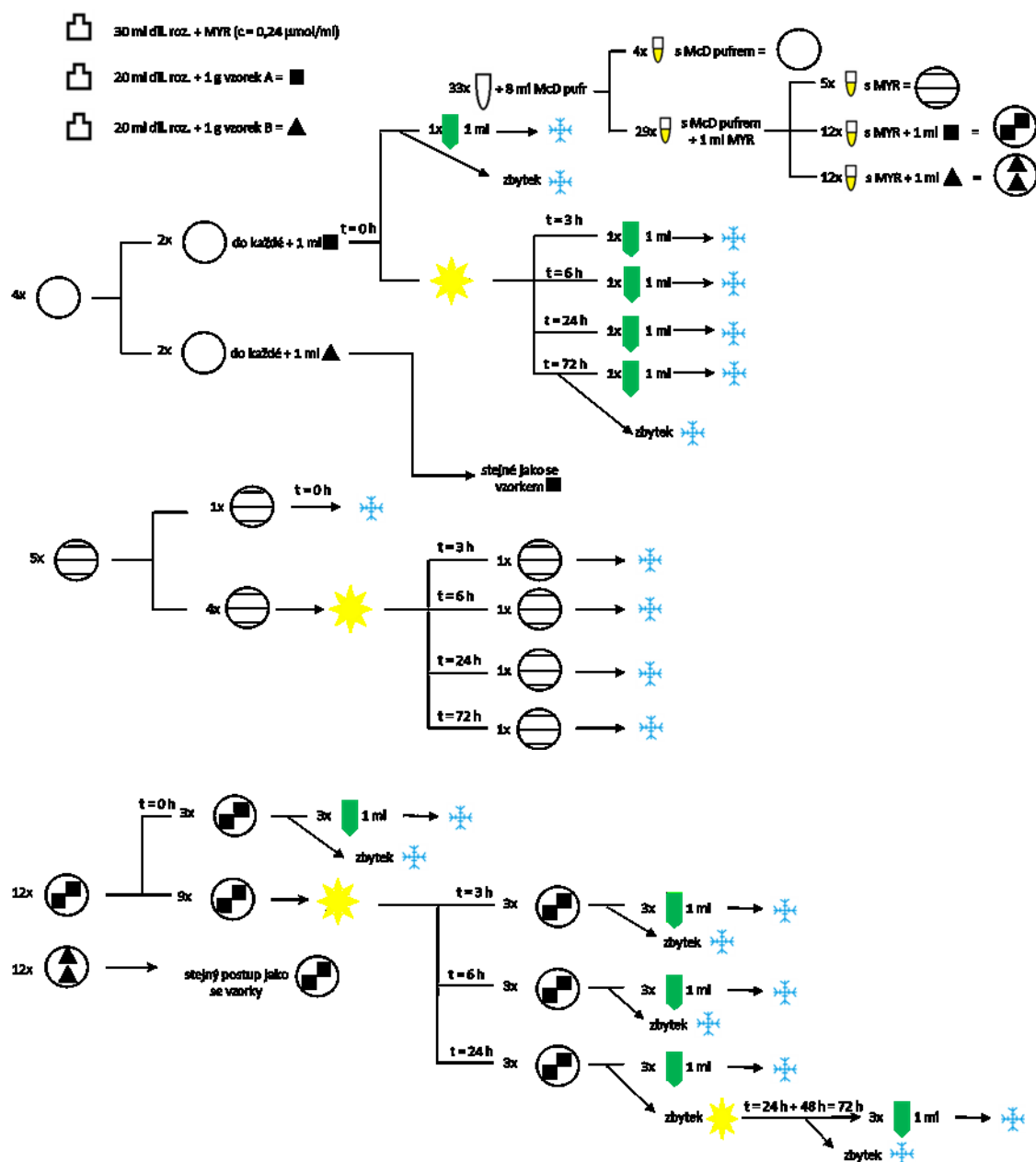
Vzorky v jednotlivých časech inkubace byly zamrazeny na -20 °C v triplicátech. Zamrazeny byly vždy oba vzorky.

V čase 0 hodin byly zamrazeny 3 kultivační zkumavky obsahující MYR s fekálními vzorky. Zbylé kultivační zkumavky s přidaným MYR byly vloženy do inkubátoru (Biological Thermostat BT 120) a inkubovány při teplotě 37 °C. Další kultivační zkumavky s přidaným MYR byly zamrazeny v čase 3, 6 a 72 hodin. Ve všech výše zmíněných časech byly zamrazeny i připravené kultivační zkumavky s McD pufrem a MYR. V čase 72 hodin byla zamrazena druhá z připravených kultivačních zkumavek obsahující NK-McD.

#### **4.2.3 Příprava vzorků pro určení vlivu MYR na biodiverzitu mikroflóry**

Vzorky pro zjišťování vlivu MYR na biodiverzitu střevní mikroflóry poskytnuté od dárce A i B byly připravovány v triplicátech. Negativní kontroly byly odebrány po jedné mikrozkušavce. Z připravených kultivačních zkumavek obsahujících NK-McD bylo v příslušných časech (0, 3, 6, 24 a 72 hodin) odebráno po 1 ml suspenze do čisté mikrozkušavky. Po odběru byla mikrozkušavka se suspenzí zamrazena na -20 °C. Z kultivačních zkumavek v čase 0 hodin bylo odebráno po 1 ml suspenze a zamrazeno. Všechny ostatní kultivační zkumavky s MYR a fekálními vzorky byly vloženy do inkubátoru (Biological Thermostat BT 120) a inkubovány při teplotě 37 °C. Po uplynutí 3, 6, 24 a 72 hodin bylo taktéž odebráno po 1 ml suspenze a převedeno do mikrozkušavek, které byly i hned zamrazeny. Po odběru v čase 24 hodin byly kultivační zkumavky vráceny do inkubátoru a bylo z nich odebráno i po 72 hodinách.

Kultivační zkumavky použité pro odběry jsou ty samé, které byly zmíněny v kapitole 4.2.2.



Obrázek 5: Ilustrační znázornění postupu práce shrnuté v kapitole 4.2.1, 4.2.2 a 4.2.3. Použité symboly:

skleněná lahvička, kultivační zkumavka, mikrozukavka, zamrazení na  $-20^\circ\text{C}$ , inkubace při  $37^\circ\text{C}$ .

#### 4.2.4 Extrakce myricetinu z fekálních vzorků

Pro extrakci byly použity, od každého fekálního vzorku, všechny tři zamrazené kultivační zkumavky, do kterých byl přidán MYR (čas zamrazení  $t = 0, 3$  a  $6$  hodin). Dále byly použity kultivační zkumavky obsahující pouze McD pufr a MYR ( $t = 0, 3$  a  $6$  hodin) a také negativní kontrola bez přidaného MYR od vzorku A i B, zamrazená v čase  $0$  hodin inkubace. Po rozmrazení byly kultivační zkumavky promíchány na Vortexu a následně

odebrány 2 ml inkubační směsi do vysokých zkumavek. Zbylá inkubační směs v kultivačních zkumavkách byla opět zamrzena pro další použití. V dalším kroku bylo upraveno pH přidavkem 10  $\mu$ l 99% kyseliny octové a obsah zkumavek promíchán na Vortexu. Dále byl do směsi přidán vnitřní standard (30  $\mu$ l 10mM roztoku chlorzoxazonu (CHL) rozpuštěného v methanolu) a vše bylo opět promícháno na Vortexu. Ke směsi bylo přidáno 6 ml ethylacetátu a směs byla extrahována na Vortexu po dobu 90 s. Po dokončení extrakce byla směs převedena do centrifugačních zkumavek opatřené uzávěrem a chlazená v lednici 10 minut. Dále byla směs centrifugována po dobu 10 minut při  $2254 \times g$  (centrifuga EBA 270 s výkyvným rotorem  $6 \times 15$  ml). Ethylacetátová fáze (cca 5 ml) byla odebrána a rozdělena po 1 ml do mikrozkušavek. Odpařování probíhalo při  $36^\circ\text{C}$  na vakuovém centrifugačním zahušťovacím zařízení (CentriVap, Labconco) po dobu cca 250 minut. Odparky usazené na dně mikrozkušavky byly rozpuštěny ve 50  $\mu$ l methanolu. V posledním kroku byla mikrozkušavka s rozpuštěným odparkem centrifugována po dobu 30 s (minicentrifuga Spectrafuge<sup>TM</sup> s úhlovým rotorem  $6 \times 2$  ml,  $850 \times g$ ). Supernatanty byly separovány na RP-HPLC (z angl. „reverse phase-high performance liquid chromatography“ – vysokoúčinná kapalinová chromatografie na reverzní fázi) (viz. kapitola 4.2.5).

#### 4.2.5 Metoda RP-HPLC

Do vialek tvaru „Champagne“ bylo přeneseno po 25  $\mu$ l methanolvých roztoků připravených extrakcí inkubačních směsí. Zbytky roztoků byly uschovány při  $-20^\circ\text{C}$  pro další použití. Dále byl připraven roztok standardu, který obsahoval 6  $\mu$ l MYR (koncentrace 10 mM), 6  $\mu$ l DHM (koncentrace 10 mM), 30  $\mu$ l chlorzoxazonu (koncentrace 10 mM) a 33  $\mu$ l methanolu. Vialky se vzorky a standardem byly umístěny do stojanu automatického dávkovače a byly analyzovány metodou RP-HPLC s UV-detekcí (HPLC Agilent 1200 series). Pro analýzu byla použita monolitická kolona Chromolith RP-18 E. Použitý HPLC systém byl složen ze čtyřkanálové peristaltické pumpy, automatického dávkovače (ALS G1329A), vakuového degasseru (G1322A) a termostatovaného držáku na kolony (LCO102, ECOM s.r.o.).

Z bakalářské práce Hucková [43] bylo převzato složení mobilní fáze. Mobilní fáze byla připravena do tří zásobních lahví. Mobilní fáze A obsahovala 40% methanol s 0,1% kyselinou trifluoroctovou (TFA), mobilní fáze B byl 100% methanol a mobilní fáze C byla tvořena ultračistou vodou s 0,1% TFA. Ultračistá voda byla před použitím ještě vakuově přefiltrována systémem Stericup<sup>®</sup>.

Pro analýzu byla použita gradientová eluce podle McDougall [42]. V Tabulce 1 (str. 23) je zaznamenáno složení gradientu mobilní fáze v jednotlivých intervalech během analýzy vzorku. Analýza jednoho vzorku trvala 20 minut. Průtok mobilní fáze kolonou po celou dobu analýzy byl nastaven na 1,5 ml/min. Tlak v koloně se pohyboval okolo 56 barů. Kolona byla temperována na teplotu 35 °C. Detekce probíhala při vlnových délkách 280 nm, 290 nm, 340 nm a 370 nm. Pro analýzu bylo na kolonu nastříknuto vždy 5 µl vzorku.

Tabulka 1: Složení gradientu mobilní fáze během analýzy vzorku metodou RP-HPLC

t [min]	Mob. f. A [%]	Mob. f. B [%]	Mob. f. C [%]
0 - 5,5	40	0	60
6,5 - 15,5	80	0	20
16,0 - 17,5	50	50	0
18,0 - 20,0	40	0	60

**Legenda:** Mob. f. (A, B, C) – procentuálně vyjádřené složení mobilní fáze procházející kolonou v jednotlivých časových úsecích analýzy. Složení fází: fáze A – 40% methanol 0,1% TFA, fáze B – 100% methanol, fáze C – ultračistá voda s 0,1% TFA

#### 4.2.6 Izolace bakteriální DNA

Pro izolaci bakteriální DNA z fekálních vzorků byla použita souprava „QIAamp® PowerFecal® DNA Kit“ (QIAGEN). Na začátek byly rozmrazeny vzorky (1 ml) odebírané do mikrozkušavek během kultivace bakterií. Mikrozkušavky byly centrifugovány (centrifuga Labnet Prism R) po dobu 1 minuty při  $3384 \times g$ . Po centrifugaci byl supernatant odstraněn a do mikrozkušavky bylo přidáno 750 µl roztoku „PowerBeat Solution“ a peleta uvnitř byla resuspendována. Celý objem s resuspendovanou peletou byl přenesen do mikrozkušavky typu „Dry Beat Tube“ a bylo přidáno 60 µl roztoku „Solution C1“. Vše bylo promícháno na Vortexu. Poté byly vzorky vloženy na 10 minut do vodní lázně (Julabo TW12) vyhřáté na 70 °C. Po uplynutí 10 minut byly vzorky umístěny do homogenizátoru (FastPrep®-24) a homogenizovány 1 minutu při  $6,5 \times g$ . Zahřátí ve vodní lázni a následná homogenizace byla ještě jednou zopakována. Následně byly mikrozkušavky centrifugovány 1 minutu při  $13\,000 \times g$  (centrifuga Labnet Prism R). Po centrifugaci bylo přeneseno 500 µl supernatantu do 2ml zkušavky typu „Collection Tube“ a bylo přidáno 250 µl roztoku „Solution C2“. Mikrozkušavky byly promíchány na Vortexu a umístěny na 5 minut do chladicí boxu s ledem. Opět byl celý obsah mikrozkušavky centrifugován 1 minutu při  $13\,000 \times g$ . Zhruba 600 µl vzniklého supernatantu bylo přeneseno do nové mikrozkušavky „Collection Tube“ a bylo přidáno 200 µl „Solution C3“. Vše bylo

promícháno na Vortexu a mikrozkuhavky byly umístěny do chladicího boxu s ledem na dalších 5 minut. Po chlazení následovala centrifugace za stejných podmínek jako v předchozím kroku. Vzniklý supernatant, 600  $\mu$ l, byl převeden do nové mikrozkuhavky „Collection Tube“ a bylo přidáno 1200  $\mu$ l roztoku „Solution C4“, který byl před použitím promíchán. Mikrozkuhavky s roztokem byly promíchány na Vortexu. Dále byl celý objem po částech (max. 650  $\mu$ l) přefiltrován přes kolonku „MB Spin Column“. Pro filtraci bylo využito centrifugace po dobu 1 minuty při  $13\,000 \times g$ . Veškerý supernatant byl odstraněn. Po přefiltrování celého obsahu z mikrozkuhavky „Collection Tube“ bylo na kolonku dávkováno 500  $\mu$ l roztoku „Solution C5“ a opět centrifugováno 1 minutu při  $13\,000 \times g$ . Poté byla provedena „centrifugace na prázdno“, 2 minuty při  $13\,000 \times g$ , pro odstranění zbylého roztoku z kolonky. Po této centrifugaci byly kolonky ponechány cca 2 minuty na vzduchu (vysychání) a pak byly umístěny do čistých „Collection Tube“. Do středu bílého terčíku na filtru v koloně bylo aplikováno 100  $\mu$ l roztoku „Solution C6“. Pro vymytí DNA z kolonky byly mikrozkuhavky s nasazenou kolonkou centrifugovány 1 minutu při  $13\,000 \times g$ . V posledním kroku byla změřena koncentrace izolované bakteriální DNA v jednotlivých vzorcích na přístroji NanoDrop One<sup>C</sup>. Mikrozkuhavky s izolovanou DNA byly zamrazeny na  $-20\,^{\circ}\text{C}$ .

#### **4.2.7 PCR-DGGE analýza bakterií**

Pro analýzu přítomných bakterií ve vzorcích metodou PCR-DGGE bylo využito metodiky dle Muyzer a kol. [9].

##### **4.2.7.1 PCR**

Pro zjištění zastoupení jednotlivých bakteriálních druhů v analyzovaných vzorcích bylo nutno amplifikovat úsek DNA kódující gen pro 16S rRNA, který je částí společný pro všechny bakterie a také zároveň obsahuje variabilní úseky pro jednotlivé druhy. Před samotným zahájením práce bylo nejprve nutné rozhodnout jaký „PCR mix“ (složení viz. Legenda u Tabulky 2 (str. 25)) bude pro analýzu použit. Na prvních čtyřech vzorcích byla provedena analýza, pro kterou byly použity 3 různé „PCR mixy“ a z nich byl na konci po provedení PCR-DGGE vybrán jeden, jenž byl použit pro kompletní analýzu všech vzorků.

Pro PCR reakci byly rozmrazeny mikrozkuhavky s izolovanou bakteriální DNA (kapitola 4.2.6). Do 40 mikrozkuhovek o obsahu 200  $\mu$ l byla připravena směs pro PCR reakci. Složení směsi pro jeden vzorek je uvedeno v Tabulce 2 (str. 25).



Tabulka 2: Složení směsi pro PCR reakci

Složka směsi	V [μl]
PCR mix	15
Primer 338GC	1
Primer 534RP	1
dH <sub>2</sub> O	11
Templát izolované DNA	2

**Legenda:** PCR mix (PPP Master Mix, Top-Bio) obsahující 150mM Tris-HCl, 40mM síran amonný, 0,02% Tween 20, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 400 μl dNTP, 100 U/ml Taq Polymerasy, barvivo, stabilizátory, aditiva, pH = 8,8 (při 25°C) 10x zředěný „Forward“ primer 338GC (5'-CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCCGGC CCGCCGCGCCGCGCCGCACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3') 10x zředěný „Reverse“ primer 534RP (5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3'); PCR dH<sub>2</sub>O (Top-Bio)

Mikrozkumavky se směsí byly vloženy do „PCR cycleru“ a byl zapnut přednastavený program pro amplifikaci DNA. Jednotlivé kroky PCR reakce jsou uvedeny v Tabulce 3 (str. 25).

Tabulka 3: Kroky PCR reakce pro amplifikaci 16S rRNA

Krok	T [°C]	t	Opakování
1	95,0	5 min	X
2	95,0	30 s	34x
3	58,0	20 s	
4	72,0	40 s	
5	72,0	5 min	X
6	8,0	5 min	X

**Legenda:** Při teplotě 95 °C dochází k teplotní denaturaci dvoušroubovice DNA, po snížení teploty na 58 °C je umožněno nasednutí primerů na rozvolněné řetězce DNA, následné zvýšení teploty na 72 °C vede k elongaci nových řetězců DNA. Krok 2, 3 a 4 byl 34x opakován pro účinnou amplifikaci DNA. Po skončení kroku 6 bylo nutno přístroj vypnout.

#### 4.2.7.1.1 Kontrola PCR reakce

Do 100 ml 0,5x TBE pufru (složení: 1M Tris, 0,9M kyselina boritá, 0,01M EDTA) byl připraven 1,5% agarosový gel. Roztok byl přiveden k varu. Poté byl roztok odstaven, aby mírně zchladl, poté byly přidány 3 μl ethidiumbromidu a vše bylo promícháno. Po zchladnutí na cca 50 °C bylo přibližně 30 ml nalito na misku pro gelovou elektroforézu.

Na gel bylo nanášeno 10 µl standardu DNA (Quick-Load® 100bp DNA Ladder, New England BioLabs) a po 2 µl náhodně vybraných PCR produktů. Elektroforéza probíhala při 100 V po dobu 20 minut. V zobrazovacím zařízení (Molecular Imager® GelDoc™ XR+, Bio-Rad) pod UV světlem bylo zjištěno, zda se na gelu nachází zóny vzorku odpovídající svou mobilitou standardu.

#### 4.2.7.2 DGGE

DGGE (z angl. „denaturing gradient gel electrophoresis“ – elektroforéza v denaturačním gradientovém gelu) je elektroforetická metoda využívaná k separaci fragmentů DNA. K dělení fragmentů dochází na základě molekulové hmotnosti (různá sekvence nukleotidů v řetězci), která má vliv na elektroforetickou pohyblivost fragmentů dsDNA (z angl. „double-stranded DNA“ – dvouvláknová DNA) polyakrylamidovým gelem. Jednotlivé fragmenty při průchodu gelem denaturují, v závislosti na počtu vodíkových můstků mezi nukleotidy v řetězci. S rostoucí denaturační silou gelu dochází k rozvolňování dsDNA a k mnohem pomalejšímu putování ssDNA (z angl. „single-stranded DNA“ – jednovláknová DNA). Pro lepší detekci jednotlivých zón se využívá sekvencí bohatých na cystein a guanin (CG-svorek), které jsou součástí primeru. Tyto „svorky“ drží DNA částečně pohromadě a zajišťují ostrost zón při detekci. Metoda DGGE má praktické využití například pro identifikaci sekvenčních variant různých druhů mikroorganismů [9].

Pro celkovou analýzu bakterií byl připraven gel s denaturační silou v rozmezí 35 – 60%. Potřebné komponenty pro přípravu jednoho gelu jsou uvedeny v Tabulce 4 (str. 26).

Tabulka 4: Složky pro přípravu 25 ml roztoku 35% a 60% polyakrylamidového gelu

Denaturační stupeň	35%	60%
40% akrylamid [ml]	5,560	5,560
50x TAE [ml]	0,500	0,500
Formamid [ml]	3,500	6,000
Močovina [g]	3,675	6,300
dH <sub>2</sub> O [ml]	12,250	9,500

Dále byla připravena aparatura pro přípravu gelu. Do systému spojených nádob byly aplikovány oba připravené roztoky (60% roztok blíž k výpusti). Bylo zapnuto míchání a do

každého z roztoků bylo přidáno 20  $\mu$ l TEMED a 200  $\mu$ l 10% roztoku vodného amonium persulfátu. Nádoby byly spojeny a bylo zapnuto peristaltické čerpadlo s dávkovačem (PCD 21, Kouřil). Gel byl nechán cca 45 minut polymerovat.

Dále byl připraven tank pro elektroforézu, který byl naplněn cca 7 l 1x TAE pufru (složení: 2M Tris, 1M kyselina octová, 50mM EDTA). Po polymeraci gelu byl gel upevněn do aparatury pro DGGE a ta byla vložena do tanku s předem vyhřátým pufrem na 60 °C. Jamky v gelu byly propláchnuty pufrem a na gel byly aplikovány vzorky (30  $\mu$ l) a standard. Elektroforéza byla zahájena při 30 V a po dosažení teploty 60 °C bylo zvýšeno napětí na 55 V. Elektroforéza probíhala 18 hodin.

Po skončení elektroforézy byl gel přenesen do nádoby s 50 ml 1x TAE pufru a 5  $\mu$ l interkalační barvy SYBR Green. Gel byl za stálého míchání barven 30 minut. Poté byl fotograficky dokumentován.

#### 4.2.8 Příprava vzorků pro sekvenování DNA fragmentů z DGGE

Podle fotografie gelu (z kapitoly 4.2.7.2) byly vybrány významné zóny (tloušťkou, svou přítomností ve vzorku s/bez MYR atd.) DNA. Ty byly z gelu vyříznuty pod UV světlem a kousky gelu byly převedeny do 1,5 ml mikrozkušavek. Do každé mikrozkušavky bylo přidáno po 100  $\mu$ l sterilní dH<sub>2</sub>O. Mikrozkušavky byly krátce promíchány na Vortexu a centrifugovány (MSE Sanyo HAWK 15/05 Refrigerated Centrifuge) 10 minut při  $12\,444 \times g$  (bez chlazení). Dále bylo potřeba namnožit DNA PCR reakcí. Do mikrozkušavek o objemu 200  $\mu$ l byla připravena směs jejíž složení je uvedeno v Tabulce 5 (str. 27).

Tabulka 5: Složení směsi pro PCR reakci

Složka směsi	V [ $\mu$ l]
PCR mix	15
Primer 341FP	1
Primer 534RP	1
dH <sub>2</sub> O	8
Voda s kouskem gelu	5

**Legenda:** PCR mix (PPP Master Mix, Top-Bio) obsahující 150mM Tris-HCl, 40mM síran amonný, 0,02% Tween 20, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 400  $\mu$ l dNTP, 100 U/ml Taq Polymerasy, barvivo, stabilizátory, aditiva,

pH = 8,8 (při 25 °C); 10x zředěný „Forward“ primer 341FP (5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3'); 10x zředěný „Reverse“ primer 534RP (5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3'); PCR dH<sub>2</sub>O (Top-Bio).

Po proběhnutí PCR reakce byla amplifikace DNA prověřena pomocí agarosové elektroforézy (provedeno stejně jako v kapitole 4.2.7.1.1). Po ověření, že DNA byla skutečně amplifikována, byla PCR směs přečištěna pomocí soupravy „QIAquick PCR purification Kit“ od firmy QIAGEN.

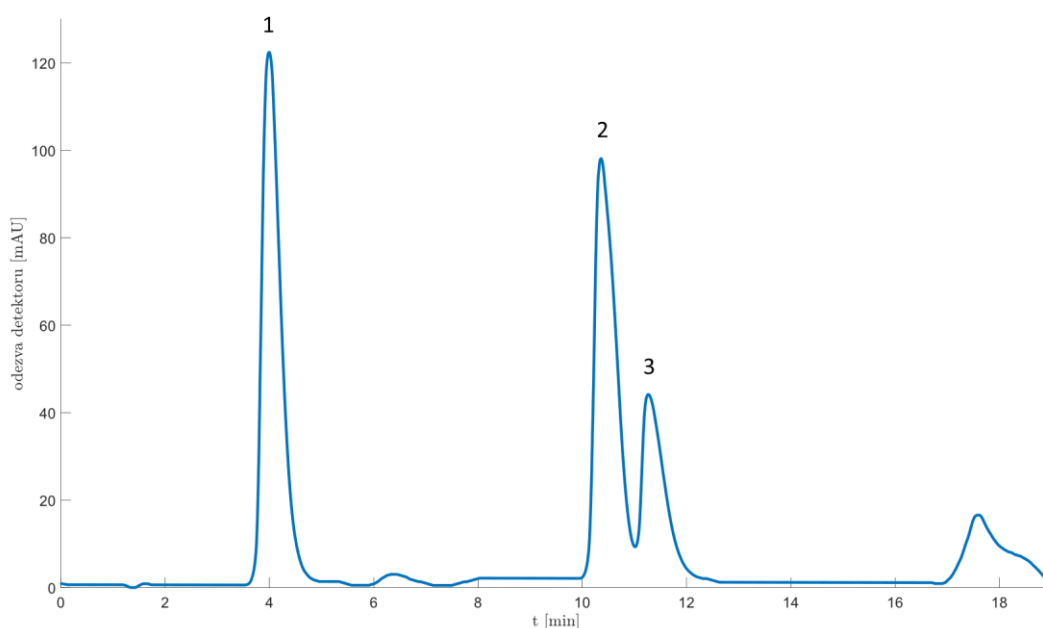
Ke 30 µl směsi pro PCR bylo přidáno 150 µl „Buffer PB“ a veškerá směs byla aplikována na kolonku „QIAquick Spin Column“ umístěnou na „Collection Tube“ (mikrozkumavka). Mikrozkumavka s kolonkou byla centrifugována (MSE Sanyo HAWK 15/05 Refrigerated Centrifuge) při  $12\,444 \times g$  po dobu 1 minuty. Obsah z mikrozkumavky byl odstraněn a na kolonku bylo přidáno 750 µl „Buffer PE“ a centrifugováno za stejných podmínek. Supernatant z mikrozkumavky byl odstraněn a kolonka s mikrozkumavkou byla centrifugována „naprázdno“ po dobu 2 minut. Kolonka byla umístěna do 1,5 ml mikrozkumavky dle Eppendorfa a na filtr bylo přidáno 40 µl elučního roztoku „Buffer EB“. Vzorky byly centrifugovány po dobu 1 minuty. Koncentrace purifikované dsDNA byla změřena na přístroji NanoDrop One<sup>C</sup>.

Do 200 µl mikrozkumavek bylo aplikováno 50 ng purifikované DNA, 2,5 µl 10x naředěného primeru (21 vzorků s „Forward“ primerem 341FP a 21 vzorků s „Reverse“ primerem 534RP) a objem v mikrozkumavce byl doplněn dH<sub>2</sub>O na 10 µl. Všechny vzorky byly odeslány na komerční sekvenování do firmy SEQme.

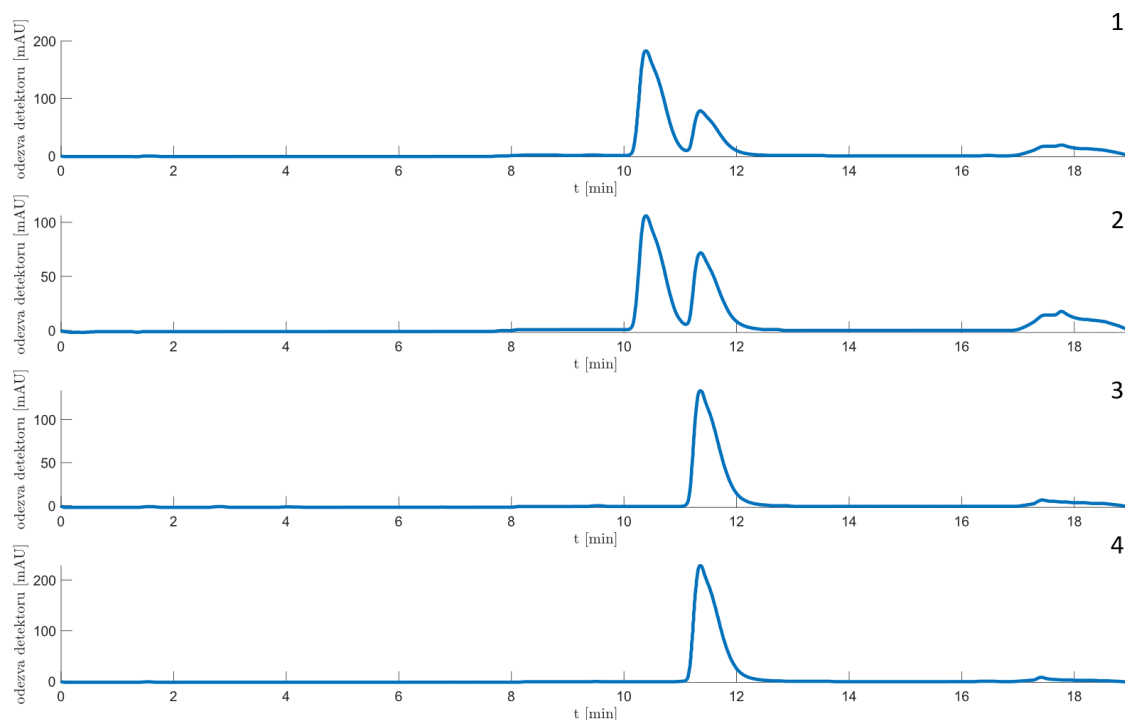
## 5 Výsledky

### 5.1 Reduktivní přeměna MYR střevní mikroflórou

Metodou RP-HPLC bylo sledováno, zda dochází k přeměně (redukci) MYR na DHM za účasti střevní mikroflóry dvou dárců. Vzorky byly poskytnuty jedincem trpícím celiakií (vzorek A) a od zdravého jedince (vzorek B). Střevní bakterie obsažené ve fekálních vzorcích byly kultivovány v přítomnosti MYR v McD pufru. Vzorky kultivací byly analyzovány v čase 0-6 hodin při čtyřech vlnových délkách. Vzorky s obsahem odebraných fekálních vzorků byly porovnávány vůči směsi standardu. Chromatogram reprezentující směs standardů je znázorněn na Obrázku 6 (str. 29). Vzorek směsi standardů obsahoval 10mM DHM, 10mM MYR a 10mM CHL, rozpouštědlem byl methanol. Výsledky analýzy fekálních vzorků jsou shrnuty na Obrázku 7 (str. 30), kde jsou znázorněny reprezentativní chromatogramy při všech vlnových délkách.



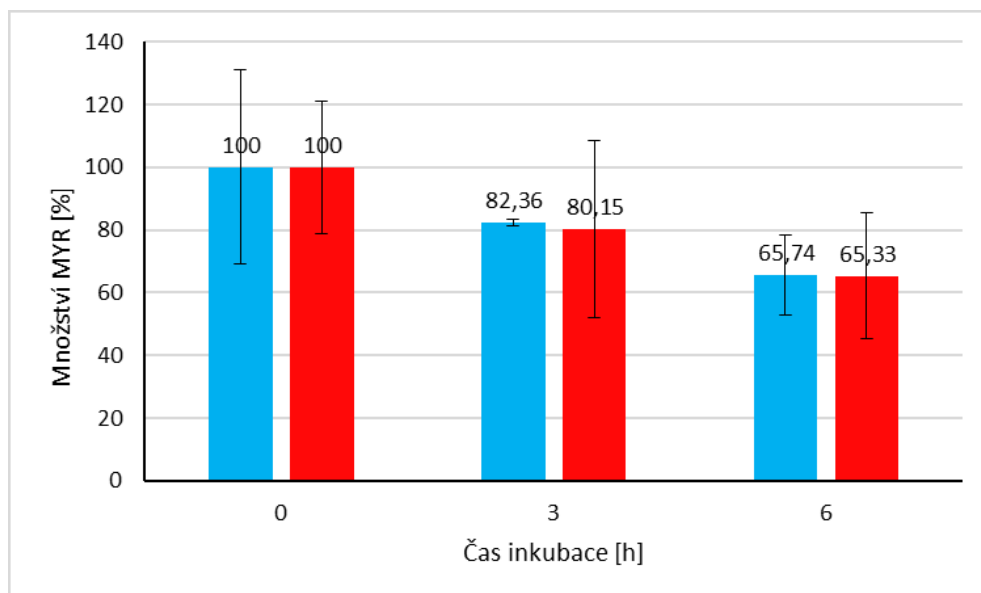
Obrázek 6: Reprezentativní chromatogram vzorku standardu. Vzorek obsahoval 6  $\mu$ l 10mM DHM, 6  $\mu$ l 10mM MYR, 30  $\mu$ l 10mM CHL a 33  $\mu$ l methanolu. Na Obrázku jsou vyznačeny píky přítomných látek (1) DHM, (2) CHL a (3) MYR. Vzorky byly analyzovány na koloně Chromolith RP-18 E (nástrikový objem 5  $\mu$ l, průtoková rychlost 1,5 ml/min, tlak cca 56 barů, doba analýzy 20 minut, detekce při 280 nm, složení mobilní fáze A: 40% methanol s 0,1% TFA, B: 100% methanol, C: ultračistá voda s 0,1% TFA).



Obrázek 7: Reprezentativní chromatogramy fekálního vzorku A v čase 6 hodin inkubace při různých použitých vlnových délkách detekce. Chromatogram (1) reprezentuje analýzu s detekcí při vlnové délce 280 nm. Chromatogram (2) je reprezentující pro detekce při 290 nm, chromatogram (3) reprezentuje vlnovou délku 340 nm a chromatogram (4) platí pro detekci při 370 nm. Vzorky byly analyzovány na koloně Chromolith RP-18 E (nástríkový objem 5  $\mu$ l, průtoková rychlost 1,5 ml/min, tlak cca 56 barů, doba analýzy 20 minut, složení mobilní fáze A: 40% methanol s 0,1% TFA, B: 100% methanol, C: ultračistá voda s 0,1% TFA).

### 5.1.1 Kultivace vzorků A a B s MYR

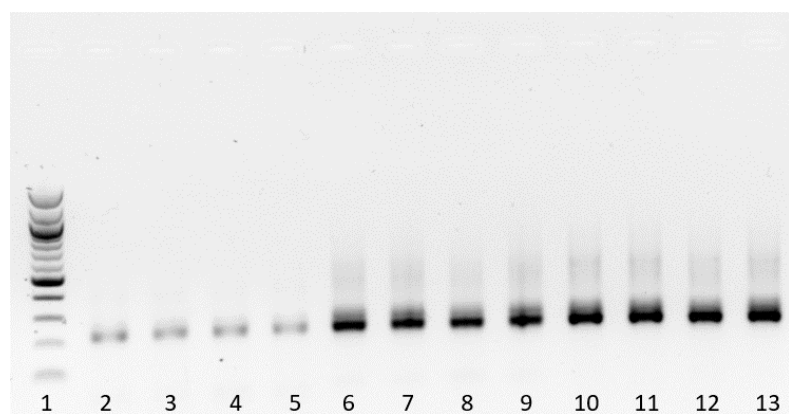
Inkubační směsi lidských fekálních bakterií získané z odebraných fekálií od dárce s CD a zdravého jedince byly kultivovány v přítomnosti MYR za anaerobních podmínek, extrahovány do ethylacetátu a dále analyzovány na monolitické koloně Chromolith RP-18 E metodou RP-HPLC. Každý vzorek byl měřen třikrát. Výsledky získané z analýzy jednotlivých vzorků byly průměrovány a byl z nich sestaven graf, který porovnává degradaci MYR mezi oběma vzorky v rozmezí inkubace 0 až 6 hodin. Graf je uveden na Obrázku 8 (str. 31). Při analýze se předpokládá, že v čase 0 hodin vzorek obsahoval 100 % MYR. Degradace MYR je vztažena k vnitřnímu standardu CHL obsaženému v měřeném vzorku.



Obrázek 8: Porovnání degradace MYR fekální mikroflórou v průběhu 6 hodin. Modré sloupce znázorňují degradaci MYR ve vzorku A, červené ve vzorku B. Oba vzorky byly inkubovány s MYR za anaerobních podmínek, extrahovány do ethylacetátu a analyzovány metodou RP-HPLC. Úbytek MYR je vztažen k jeho množství (100 %) v čase 0 hodin.

## 5.2 Agarosová elektroforéza

Po amplifikaci DNA kódující gen pro 16S rRNA byla provedena agarosová elektroforéza náhodně vybraných vzorků. Smyslem této elektroforézy bylo ověřit, zda došlo k dostatečné amplifikaci příslušného genu a nebyly dále používány vzorky, které by neposkytly zónu odpovídající 200bp. Vzorky, u kterých by nedošlo k dostatečné amplifikaci, by nemusely poskytnout výsledek po provedení DGGE. Na Obrázku 9 (str. 31) je agarosový gel ověřující přítomnost amplifikované DNA kódující gen pro 16S rRNA.

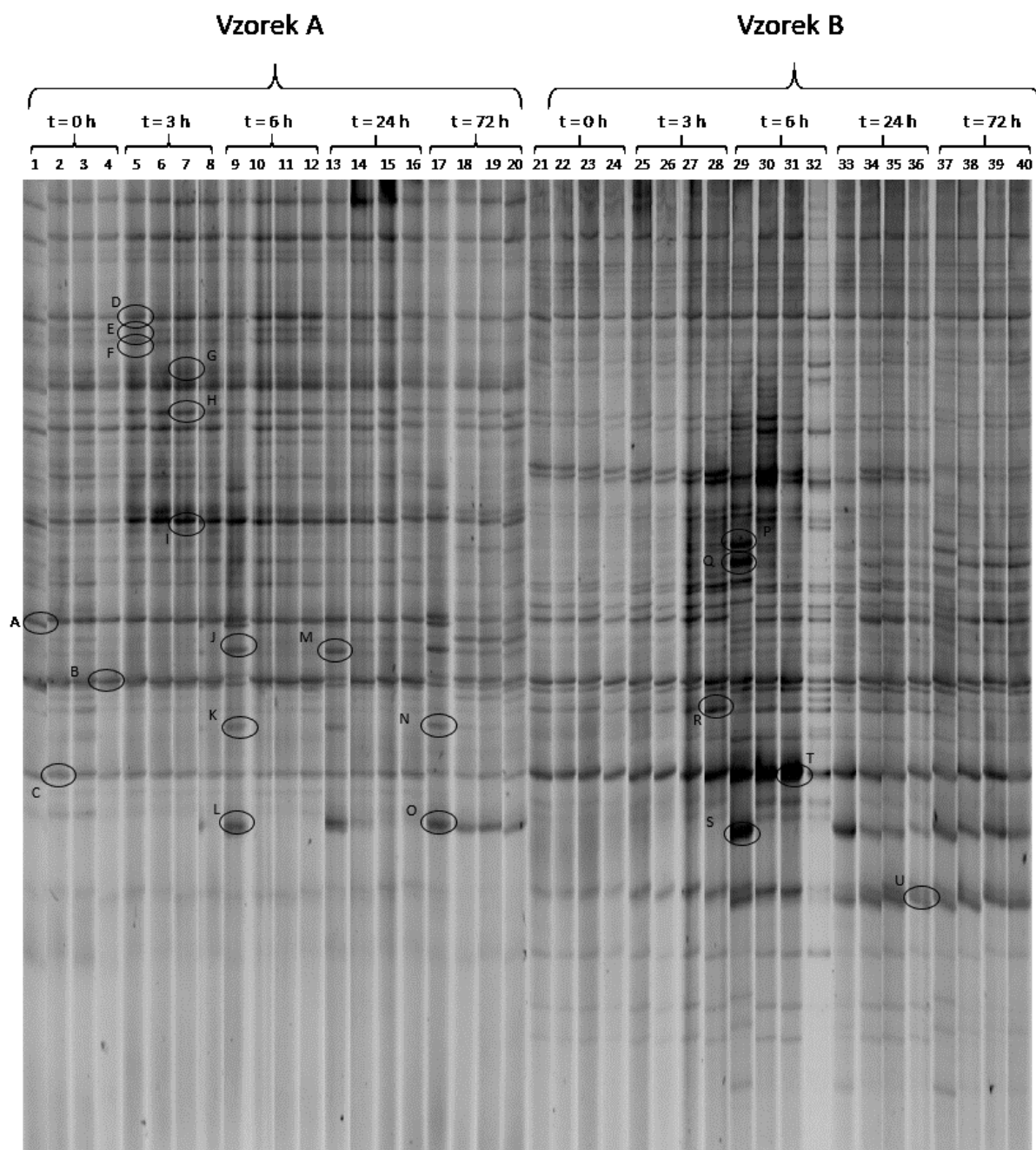


Obrázek 9: Fotografie agarosového gelu s DNA kódující gen pro 16S rRNA. Dráha č. 1 je standardní vzorek DNA (Quick-Laod® 200bp DNA Ladder). Ostatní dráhy patří náhodně vybraným vzorkům ze souboru všech vzorků, u kterých byla provedena PCR reakce.

### **5.3 Vliv MYR na biodiverzitu střevní mikroflóry**

Po třídenní inkubaci lidských fekálních vzorků s MYR byl sledován vliv přidaného flavonoidu na biodiverzitu střevních bakterií obsažených ve vzorcích. Pro zjištění biodiverzity bylo nutné nejprve izolovat bakteriální DNA a amplifikovat ji metodou PCR. Amplifikována byla DNA kódující gen pro 16S rRNA v kultivovaných bakteriích. Z amplifikované DNA pro 16S rRNA byla zjišťována diverzita bakteriálních populací ve fekálních vzorcích metodou DGGE. Bylo sledováno, zda došlo v průběhu 72hodinové inkubace a v důsledku přítomnosti MYR ke změně v zastoupení bakteriálních kmenů. Gel z analýzy DGGE je zobrazen na Obrázku 10 (str. 33).





Obrázek 10: Fotografie akrylamidového gelu po provedené DGGE amplifikované DNA kódující gen pro 16S rRNA v kultivovaných bakteriích z fekálních vzorků. Na Obrázku jsou dráhy pro jednotlivé fekální vzorky pořízené od dárce A a B inkubované v McD pufru v průběhu 72 hodin. Dráhy 1-20 jsou vzorky od dárce A, dráhy 21-40 náleží vzorkům od dárce B. Vzorky v drahách 1, 5, 9, 13, 17, 21, 25, 29, 33 a 37 neobsahují přídavek MYR. Ostatní dráhy jsou s přídavkem MYR a tvoří vždy triplikáty nezávislých vzorků v časech inkubace 0, 3, 6, 24 a 72 hodin. Kroužky na obrázku značí zóny, které byly odeslány k sekvenaci. Písmena u kroužků odpovídají písmenům fragmentů z Tabulky 6 (str. 34).

## 5.4 Určení bakteriálních druhů přítomných ve fekálních vzorcích

Po provedení metody DGGE byly z akrylamidových gelů vyříznuty vybrané charakteristické zóny (tloušťkou, svou přítomností ve vzorku s/bez MYR atd.) reprezentující vyskytující se bakteriální druhy v odebraných vzorcích. DNA přítomná ve vyříznutých kouscích gelu byla amplifikována metodou PCR a vzorky s namnoženou DNA kódující gen pro 16S rRNA byly předány firmě SEQme k sekvenaci.

Všechny zóny, které byly odeslány k sekvenaci jsou vyznačeny kroužky na Obrázku 10 (str. 33). Při vyhodnocování fotografií bylo předpokládáno, že zóny se stejnou vzdáleností od startu obsahují DNA kódující gen pro 16S rRNA náležící jednomu druhu bakterie.

Ze získaných sekvencí se podařilo identifikovat pouze některé z přítomných bakteriálních druhů. Přehled identifikovaných bakteriálních druhů je shrnut v Tabulce 6 (str. 34).

Tabulka 6: Přehled identifikovaných bakteriálních druhů.

Fragment	Název	Identita	ID v databázi
A	<i>Eubacterium rectale</i>	95 %	NR_074634.1
B	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	94 %	NR_028961.1
C	<i>Gemmiger formicilis</i>	91 %	NR_104846.1
L	<i>Escherichia coli</i>	95 %	NR_114042.1
O	<i>Escherichia coli</i>	87 %	NR_114042.1
S	<i>Escherichia coli</i>	91 %	NR_114042.1
T	<i>Gemmiger formicilis</i>	94 %	NR_104846.1

**Legenda:** V tabulce jsou uvedeny pouze identifikované druhy bakterií. Ostatní druhy se nepodařilo ze získaných sekvencí určit.

## 6 Diskuse

Redukční metabolismus MYR střevní mikroflórou byl již zkoumán v práci Huškové [44] a Huckové [43]. Tato bakalářská práce na ně navazuje. Snahou práce bylo pokusit se dokázat redukční metabolismus MYR na DHM, za účasti střevní mikroflóry. Pro výzkum byl odebrán fekální vzorek od zdravého jedince, který se stravuje běžnou stravou a od celiaka, jenž dodržuje striktní bezlepkovou dietu. Zároveň se sledováním metabolismu byl pozorován vliv MYR na růst bakterií a dále vliv onemocnění na biodiverzitu bakterií.

V práci Bokkenheuser a kol. [45] byl sledován metabolismus flavonoidů (robinin, rutin a quercitrin). Detekovanými metabolity, produkty hydrolýzy, byly quercetin (rutin, quercitrin), 3-glukosylquercitrin (rutin) a kaempferol (robinin). Další studií na degradaci flavonoidů střevní mikroflórou je práce Raffi a kol. [34], v níž byl zkoumán redukční metabolismus flavonoidu daidzein, u kterého se podařilo prokázat redukční metabolismus střevní mikroflórou na sloučeniny jako dihydrodaidzein, equol a *O*-DMA. MYR je flavonoid vyskytující se v běžné stravě. Stejně jako u výše zmíněného daidzeinu existuje k MYR redukovaná forma dihydromyricetin. U DHM byly prokázány účinky proti alkoholu přítomnému v organismu [46]. Přípravky obsahující DHM by mohly zlepšovat toleranci vůči alkoholu. V případě, že by se podařilo prokázat metabolismus MYR na DHM střevní mikroflórou, znamenalo by to jistý průlom a možnost dalšího vývoje léku a přípravků, působících proti alkoholu v organismu.

Z Obrázku 7 (str. 30) je zřejmé, že po inkubaci fekální mikroflóry ze vzorku A s MYR v čase 6 hodin se nepodařilo detekovat DHM. Detekce DHM se nezdařila ani v jednom vzorku v žádném zvoleném inkubačním čase (podobně jako v předchozí práci [43] a [44]). Pro ověření, zda je střevní mikroflóra schopna degradovat MYR na DHM, stejně jako v případě daidzeinu, byl použito malý počet fekálních vzorků. Navíc, jak je známo, proces metabolismu cizorodých látek střevní mikroflórou je velmi složitý. I tak lze říct, že tento reduktivní metabolit (DHM) za použitých experimentálních podmínek nevzniká.

Ze srovnání degradace MYR (Obrázek 8 (str. 31)) je zřejmý úbytek MYR v průběhu 6hodinové kultivace fekálních bakterií. V této práci byla dosažena podstatně nižší degradace MYR střevní mikroflórou než bylo v práci [44] a [43]. Z grafu na Obrázku 8 (str. 31) je zřejmý stále klesající trend. Degradace MYR při použití obou fekálních vzorků byla téměř totožná. Vysvětlením nízké degradace oproti práci [44] a [43] může být nižší přítomnost fekálních bakterií využívajících MYR pro svůj růst a množení, nebo tyto fekální bakterie

potřebují pro své množení dostatek živin, které v McD pufru nejsou přítomny. Dalším důvodem může být, že přítomné bakterie degradovaly MYR pomalu. Zjištění prakticky stejné degradace v obou fekálních vzorcích může být způsobeno do jisté míry genetickou příbuzností (sourozenci) obou dárců, kteří jsou si dále blízcí věkem a prostředím, ve kterém žijí. Přestože ve složení mikrobiomu lze nalézt rozdíly v důsledku celiakie, kterou jeden z dárců trpí, nesmí se opomenout právě genetické podmínění, jak zmiňuje práce Kurilshikov a kol. [4]. Zajímavé by bylo sledovat degradaci MYR fekálními bakteriemi poskytnutými od rodičů dárců a najít souvislosti mezi jednotlivými generacemi.

V mnoha studiích je zkoumán vliv onemocnění na složení mikrobiomu. Například studie Marasco a kol. [26] popisuje zastoupení bakteriálních druhů ve střevech celiaka. Prokazuje zvýšení počtu druhů *Clostridium* a *Eubacterium* a naopak snížený podíl probiotických a protizánětlivých *Bifidobacterium*. Nedostatek těchto protizánětlivých bakterií může mít vliv na rozvoj zánětu či vznik karcinomu tlustého střeva.

Z DNA, získané po provedené DGGE, se podařilo určit některé přítomné druhy bakterií. Všechny identifikované bakterie jsou uvedeny v Tabulce 6 (str. 34). Pokud lze předpokládat, že intenzita zóny na fotografii gelu (Obrázek 10 (str. 33)) odpovídá hustotě zastoupení bakteriálního druhu, tak bakterie *Gemmiger formicilis* jsou zastoupeny v hojnějším počtu ve vzorcích od zdravého dárce, naopak *Eubacterium rectale* osidluje ve větší míře střeva celiaka. Na složení zastoupení druhů má jistě vliv genetická příbuznost obou dárců. Identifikované bakterie jsou pro hostitele nepatogenní, proto nelze ani konstatovat, zda u některého z dárců hrozí nebezpečí zánětu či karcinomu.

U obou odebraných fekálních vzorků byl sledován vliv MYR na biodiverzitu bakteriálních druhů. Biodiverzita bakterií byla vyhodnocována po uplynutí 0, 3, 6, 24 a 72 hodin inkubace. Bakterie byly kultivovány za anaerobních podmínek v McD pufru. Při srovnání fotografií gelu z DGGE (Obrázek 10 (str. 33)) je pozorován rozdíl mezi oběma vzorky navzájem. Rozdíly se najdou i v průběhu 72hodinové kultivace v rámci jednoho vzorku v závislosti na přidaném či nepřidaném MYR. Z pořízené fotografie (Obrázek 10 (str. 33)) je u vzorku B, poskytnutého zdravým dárce, pozorován větší rozdíl v biodiverzitě bakteriálních druhů. Přidaný MYR zjevně ovlivňuje růst bakterií během kultivace. Například zóny popsané jako *Eubacterium rectale* se ve vzorku B bez přidaného MYR ztrácí po 6 hodinách inkubace. U vzorku A se naopak po 6 hodinách inkubace objevují zóny identifikující nové bakterie. Tyto zóny se vyskytly ve třech případech, a to pouze v drahách

bez přidaného MYR. Stejně jako u vzorku B jsou zde zóny, které jsou přítomny pouze v drahách s přítomným MYR.

Předkládaná pilotní studie naznačila další možný směr výzkumu interakcí lidského mikrobiomu s látkami přijímanými v potravě. Významné jistě bude pokusit se o identifikaci dalších druhů bakterií, které se ve vzorcích objevují v důsledku expozice mikrobiomu přijímaných cizorodých sloučenin. Důležité bude prokázat, zda nemají patogenní nebo karcinogenní potenciál.

## 7 Souhrn

Cílem této práce bylo zjistit, zda v přítomnosti střevních bakterií za anaerobních podmínek dochází k přeměně myricetinu na dihydromyricetin. Zároveň byl sledován vliv MYR na zastoupení jednotlivých bakteriálních kmenů ve vzorcích, v závislosti na době inkubace. K provedení úlohy byly použity již vyzkoušené a optimalizované metody.

- Pomocí metody RP-HPLC byla v průběhu 6 hodin, za účasti fekálních bakterií a anaerobních podmínek sledována přeměna MYR na DHM. Tato přeměna se neprokázala ani u jednoho z lidských fekálních vzorků.
- Za pomoci PCR a metody DGGE se podařilo identifikovat vybrané bakteriální druhy. Byl potvrzen rozdíl v zastoupení jednotlivých bakteriálních druhů mezi oběma dárci fekálních vzorků. Zároveň byl prokázán vliv MYR na růst fekálních bakterií.

## 8 Seznam literature

1. Cho, I., Blaser, M.J. (2012) The human microbiome: at the interface of health and disease. *Nat. Rev. Genet.* **13**, 260–70.
2. Wang, Q., Wang, K., Wu, W., Giannoulatou, E., Ho, J.W.K., Li, L. (2019) Host and microbiome multi-omics integration: applications and methodologies. *Biophys. Rev.* **11**, 55–65.
3. Simon, G.L., Gorbach, S.L. (1982) Intestinal microflora. *Med. Clin. North Am.* **66**, 557–74.
4. Kurilshikov, A., Wijmenga, C., Fu, J., Zhernakova, A. (2017) Host Genetics and Gut Microbiome: Challenges and Perspectives. *Trends Immunol.* **38**, 633–47.
5. Ansari, S., Yamaoka, Y. (2017) Survival of *Helicobacter pylori* in gastric acidic territory. *Helicobacter* **22**, e12386.
6. Fukui, H. (2015) Gut Microbiota and Host Reaction in Liver Diseases. *Microorganisms* **3**, 759–91.
7. Satokari, R., Grönroos, T., Laitinen, K., Salminen, S., Isolauri, E. (2009) Bifidobacterium and Lactobacillus DNA in the human placenta. *Lett. Appl. Microbiol.* **48**, 8–12.
8. Martin, R., Makino, H., Cetinyurek Yavuz, A., Ben-Amor, K., Roelofs, M., Ishikawa, E., Kubota, H., Swinkels, S., Sakai, T., Oishi, K., Kushiro, A., Knol, J. (2016) Early-Life Events, Including Mode of Delivery and Type of Feeding, Siblings and Gender, Shape the Developing Gut Microbiota. *PLoS One* **11**, e0158498.
9. Ruggles, K.V., Wang, J., Volkova, A., Contreras, M., Noya-Alarcon, O., Lander, O., Caballero, H., Dominguez-Bello, M.G. (2018) Changes in the Gut Microbiota of Urban Subjects during an Immersion in the Traditional Diet and Lifestyle of a Rainforest Village. *MSphere* **3**, e00193-18.
10. Moore, W.E.C., Holdeman, L.V. (1974) Human Fecal Flora: The Normal Flora of 20 Japanese-Hawaiians. *Appl. Microbiol.* **27**, 961–79.

11. Muyzer, G., de Waal, E.C., Uitterlinden, A.G. (1993) Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 695–700.
12. Hill, M.J. (1997) Intestinal flora and endogenous vitamin synthesis. *Eur. J. Cancer Prev.* **6 Suppl 1**, S43-45.
13. D’Argenio, V., Salvatore, F. (2015) The role of the gut microbiome in the healthy adult status. *Clin. Chim. Acta* **451**, 97–102.
14. Grossman, R.F. (1991) The relationship of absorption characteristics and gastrointestinal side effects of oral antimicrobial agents. *Clin. Ther.* **13**, 189–93.
15. den Besten, G., van Eunen, K., Groen, A.K., Venema, K., Reijngoud, D.-J., Bakker, B.M. (2013) The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. *J. Lipid Res.* **54**, 2325–40.
16. Gao, Z., Yin, J., Zhang, J., Ward, R.E., Martin, R.J., Lefevre, M., Cefalu, W.T., Ye, J. (2009) Butyrate improves insulin sensitivity and increases energy expenditure in mice. *Diabetes* **58**, 1509–17.
17. Sivaprakasam, S., Prasad, P.D., Singh, N. (2016) Benefits of short-chain fatty acids and their receptors in inflammation and carcinogenesis. *Pharmacol. Ther.* **164**, 144–51.
18. Fukiya, S., Arata, M., Kawashima, H., Yoshida, D., Kaneko, M., Minamida, K., Watanabe, J., Ogura, Y., Uchida, K., Itoh, K., Wada, M., Ito, S., Yokota, A. (2009) Conversion of cholic acid and chenodeoxycholic acid into their 7-oxo derivatives by *Bacteroides intestinalis* AM-1 isolated from human feces. *FEMS Microbiol. Lett.* **293**, 263–70.
19. Ridlon, J.M., Kang, D.-J., Hylemon, P.B. (2006) Bile salt biotransformations by human intestinal bacteria. *J. Lipid Res.* **47**, 241–59.
20. Cenit, M.C., Olivares, M., Codoñer-Franch, P., Sanz, Y. (2015) Intestinal Microbiota and Celiac Disease: Cause, Consequence or Co-Evolution? *Nutrients* **7**, 6900–6923.
21. Scher, J.U. (2016) The microbiome in celiac disease: Beyond diet-genetic interactions. *Cleve. Clin. J. Med.* **83**, 228–30.



22. Cukrowska, B., Sowińska, A., Bierła, J.B., Czarnowska, E., Rybak, A., Grzybowska-Chlebowczyk, U. (2017) Intestinal epithelium, intraepithelial lymphocytes and the gut microbiota - Key players in the pathogenesis of celiac disease. *World J. Gastroenterol.* **23**, 7505–18.
23. Kaukinen, K., Lindfors, K. (2015) Novel treatments for celiac disease: glutenases and beyond. *Dig. Dis.* **33**, 277–81.
24. Biesiekierski, J.R. (2017) What is gluten? *J. Gastroenterol. Hepatol.* **32 Suppl 1**, 78–81.
25. Rossi, M., Schwartz, K.B. (2010) Editorial: Celiac disease and intestinal bacteria: not only gluten? *J. Leukoc. Biol.* **87**, 749–51.
26. Marasco, G., Di Biase, A.R., Schiumerini, R., Eusebi, L.H., Iughetti, L., Ravaioli, F., Scaioli, E., Colecchia, A., Festi, D. (2016) Gut Microbiota and Celiac Disease. *Dig. Dis. Sci.* **61**, 1461–72.
27. Verdu, E.F., Galipeau, H.J., Jabri, B. (2015) Novel players in coeliac disease pathogenesis: role of the gut microbiota. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **12**, 497–506.
28. Collado, M.C., Donat, E., Ribes-Koninckx, C., Calabuig, M., Sanz, Y. (2009) Specific duodenal and faecal bacterial groups associated with paediatric coeliac disease. *J. Clin. Pathol.* **62**, 264–69.
29. Sánchez, E., Donat, E., Ribes-Koninckx, C., Fernández-Murga, M.L., Sanz, Y. (2013) Duodenal-mucosal bacteria associated with celiac disease in children. *Appl. Environ. Microbiol.* **79**, 5472–79.
30. Axon, D.R., Vanova, J., Edel, C., Slack, M. (2017) Dietary Supplement Use, Knowledge, and Perceptions Among Student Pharmacists. *Am. J. Pharm. Educ.* **81**, 92, e81592.
31. Pietta, P.G. (2000) Flavonoids as antioxidants. *J. Nat. Prod.* **63**, 1035–42.
32. Fang, Y., Cao, W., Xia, M., Pan, S., Xu, X. (2017) Study of Structure and Permeability Relationship of Flavonoids in Caco-2 Cells. *Nutrients* **9**, e1301.

33. Mierziak, J., Kostyn, K., Kulma, A. (2014) Flavonoids as important molecules of plant interactions with the environment. *Molecules* **19**, 16240–65.
34. Rafii, F., Davis, C., Park, M., Heinze, T.M., Beger, R.D. (2003) Variations in metabolism of the soy isoflavonoid daidzein by human intestinal microfloras from different individuals. *Arch. Microbiol.* **180**, 11–16.
35. Frankenfeld, C.L., Atkinson, C., Wähälä, K., Lampe, J.W. (2014) Obesity prevalence in relation to gut microbial environments capable of producing equol or O-desmethylangolensin from the isoflavone daidzein. *Eur. J. Clin. Nutr.* **68**, 526–30.
36. Sirotkin, A.V., Alexa, R., Kádasi, A., Štochmaľová, A., Morovič, M., Laurinčík, J., Harrath, A.H., Grossmann, R. (2017) The isoflavone daidzein directly affects porcine ovarian cell functions and modifies the effect of follicle-stimulating hormone. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* **101**, 127–35.
37. Semwal, D.K., Semwal, R.B., Combrinck, S., Viljoen, A. (2016) Myricetin: A Dietary Molecule with Diverse Biological Activities. *Nutrients* **8**, 90, e8020090.
38. PubChem URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5281672> [Viděno květen 1, 2019].
39. Xiang, D., Wang, C.-G., Wang, W.-Q., Shi, C.-Y., Xiong, W., Wang, M.-D., Fang, J.-G. (2017) Gastrointestinal stability of dihydromyricetin, myricetin, and myricitrin: an in vitro investigation. *Int. J. Food Sci. Nutr.* **68**, 704–11.
40. Yao, Y., Lin, G., Xie, Y., Ma, P., Li, G., Meng, Q., Wu, T. (2014) Preformulation studies of myricetin: a natural antioxidant flavonoid. *Pharmazie*. **69**, 19–26.
41. Joannou, G.E., Kelly, G.E., Reeder, A.Y., Waring, M., Nelson, C. (1995) A urinary profile study of dietary phytoestrogens. The identification and mode of metabolism of new isoflavonoids. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **54**, 167–84.
42. McDougall, E.I. (1948) Studies on ruminant saliva. 1. The composition and output of sheep's saliva. *Biochem. J.* **43**, 99–109.
43. P. Hucková (2018) Úloha střevní mikroflóry v metabolismu léčiv a karcinogenů.
44. A. Hušková (2017) Interakce střevní mikroflóry s myricetinem.

45. Bokkenheuser, V.D., Shackleton, C.H., Winter, J. (1987) Hydrolysis of dietary flavonoid glycosides by strains of intestinal *Bacteroides* from humans. *Biochem. J.* **248**, 953–56.
46. Shen, Y., Lindemeyer, A.K., Gonzalez, C., Shao, X.M., Spigelman, I., Olsen, R.W., Liang, J. (2012) Dihydromyricetin as a novel anti-alcohol intoxication medication. *J. Neurosci.* **32**, 390–401.

[illegible]